

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**BÚSQUEDA DE RESPUESTA HUMORAL NEUTRALIZANTE  
EN PACIENTES VIH-1<sup>+</sup> CON NIVELES  
INDETECTABLES DE VIREMIA**

**Por**

**JOSÉ MAXIMILIANO MEDINA RAMÍREZ**

**Como Requisito Parcial Para Obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN  
EN MICROBIOLOGÍA**

**Febrero, 2012**

**BÚSQUEDA DE RESPUESTA HUMORAL NEUTRALIZANTE  
EN PACIENTES VIH-1+ CON NIVELES  
INDETECTABLES DE VIREMIA**

**Comité de Tesis**

---

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**  
Director de la tesis

---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Secretario

---

**Dr. Ricardo Gómez Flores**  
Vocal

---

**Dra. Laura Ma. Trejo Ávila**  
Vocal

---

**Dra. Lydia G. Rivera Morales**  
Vocal

---

**Dra. María Eloísa Yuste Herranz**  
Vocal

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Inmunología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González.

Este trabajo fue realizado en colaboración con la Dra. María Eloísa Yuste Herranz, en el Laboratorio de Retrovirología e Inmunopatología Viral, del Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, y el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, España.

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos

A mis Abuelos

Al Tío Armando

Al Tío Pepe (D.E.P.)

Al primo Arturo (D.E.P.)

A la Tía Tany y a mis primas

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González, a la Dra. María Eloísa Yuste Herranz, a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, al Dr. Josep María Gatell, al Dr. Felipe García, al Dr. Víctor Sánchez Merino, a la Dra. Sonsoles Sánchez Palomino, al Dr. José Alcamí, a la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, Dra. Laura María Trejo Ávila y al Dr. Ricardo Gómez Flores.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Retrovirología e Inmunopatología Viral de Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer de Barcelona.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A Carolina Barbosa Ferreira y Alberto Merino.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABLAS .....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Variabilidad del virus.....	6
2.1.1 Velocidad del ciclo de replicación.....	6
2.1.2 Tasa de mutación.....	7
2.1.3 Recombinación.....	8
2.1.4 Hipermutación mediada por factores virales y celulares.....	11
2.2 Variabilidad intrapaciente: estructura en cuasiespecie.....	12
2.3 Tipos, subtipos y formas recombinantes: caracterización biológica y aislamiento.....	14
2.3.1 Clasificación.....	14
2.4 La variabilidad como factor en la búsqueda de una cura.....	17
2.5 Los Anticuerpos Neutralizantes de Amplio Espectro como herramientas para el diseño racional de antígenos.....	21
2.5.1 Origen de los bNAbs.....	22
2.5.2 Vulnerabilidades de la ENV debido a los bNAbs.....	23
2.5.2.1 b12.....	24
2.5.2.2 2F5 y 4E10 .....	24
2.5.2.3 447-52D.....	25
2.5.2.4 2G12.....	26
2.5.3 Estrategias para el diseño de inmunógenos mediante los bNAbs.....	26
2.5.3.1 Producción de moléculas que mimetizan el trímero maduro en la superficie del virión.....	27

2.5.3.2	Producción de glicoproteínas de superficie diseñadas para presentar a los epítomos neutralizantes de una forma más eficientemente que en su estado natural.....	28
2.5.3.3	Generación de intermediarios estables del proceso de entrada.....	28
2.5.3.4	Producción de epítomos que mimeticen a los de los mAbs....	29
2.5.4	Búsqueda y estudio de nuevos Anticuerpos Neutralizantes de Amplio Espectro.....	29
2.5.5	Avances en las estrategias para la búsqueda de nuevos anticuerpos.....	30
2.5.6	Búsqueda de nuevos anticuerpos neutralizantes en la era de la Terapia Antirretroviral de Gran Actividad.....	31
2.5.7	Argumentos para excluir a pacientes bajo tratamiento de los proyectos de búsqueda de nuevos bNAbs.....	34
2.5.7.1	Riesgo a obtener falsos positivos debido a la presencia de un factor neutralizante en las muestras.....	34
2.5.7.2	Los pacientes en tratamiento no son capaces de generar bNAbs?.....	36
3.	JUSTIFICACIÓN.....	41
4.	OBJETIVOS.....	41
5.	HIPÓTEIS.....	43
6.	ESTRATEGIA GENERAL.....	44
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
7.1	Muestras de pacientes VIH-1+.....	45
7.2	Construcción de clones moleculares infecciosos de diferentes aislados primarios del VIH-1.....	47
7.2.1	Obtención del fragmento pNL4-3Δenv.....	47
7.2.2	Obtención del fragmento env de aislados primarios.....	48
7.2.3	Ligación y verificación de secuencia.....	50
7.2.4	Purificación de DNA plasmídico.....	52
7.3	Cultivo de células 293-T/17 y TZM-bl.....	53
7.3.1	Procedimiento de descongelación.....	54
7.3.2	Procedimiento de mantenimiento y pases.....	55
7.3.3	Procedimiento de conservación (congelación).....	56
7.4	Obtención de partículas virales en células 293T/17.....	57
7.4.1	Reactivos (provistos por el sistema comercial):.....	57
7.4.2	Muestras.....	58
7.4.3	Procedimiento.....	58
7.5	Elisa de captura para el antígeno p24.....	60
7.6	Ensayo de infectividad.....	60
7.7	Ensayos de neutralización.....	62
7.8	Ensayos de sensibilidad a la neutralización.....	65

7.9 Purificación de IgG y preparación de muestras para ensayos de neutralización.....	68
7.10 Ensayos in vitro para la detección de trazas de actividad antirretroviral por parte del antirretroviral efavirenz.....	69
7.11 Análisis estadísticos.....	70
8. RESULTADOS.....	71
8.1 Definición del panel de virus.....	71
8.2 Cribado inicial en la búsqueda de sueros polireactivos.....	74
8.3 Purificación de IgG a partir de sueros conteniendo efavirenz.....	76
8.4 Confirmación de que hay actividad neutralizante de amplio espectro atribuible a la fracción IgG del suero.....	78
8.5 Estabilidad de la respuesta neutralizante de amplio espectro asociada a IgG.....	80
8.6 La inducción de la actividad neutralizante no se correlaciona con la carga viral cuando los pacientes en tratamiento antirretroviral son incluidos en el estudio.....	81
9. DISCUSIÓN.....	83
10. CONCLUSIONES.....	91
11. LITERATURA CITADA.....	92



## NOMENCLATURA

APOBEC	apoplipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like
ARV	antirretroviral
bNAbs	anticuerpos neutralizantes de amplio espectro*
cDNA	DNA complementario*
CD4	cluster of differentiation 4
CDR3	complementarity determining región 3*
CRFs	formas recombinantes circulantes*
CTL	linfocito T citotóxico*
DNA	ácido desoxirribonucleico*
EFV	efavirenz
env	envelope (en referencia al gen de las glicoproteínas de superficie)
Fab	fragmento de unión a antígeno*
gp120	glicoproteína de superficie 120
gp41	glicoproteína de superficie 41
gRNA	RNA genómico*
HLA	antígeno leucocitario humano*
HSH	hombres que practican sexo con hombres
IAVI	Iniciativa Internacional para la Vacuna contra el SIDA*
ID <sub>50</sub>	dosis infecciosa media para infectar al 50% del grupo experimental
IgG	Inmunoglobulina G

Kb	kilobase
LTNP	no progresores de largo plazo*
LTR	long terminal repeat
mAbs	anticuerpos monoclonales*
MPER	región externa próxima a la membrana*
NAbs	anticuerpos neutralizantes*
NAC	consorcio para los anticuerpos neutralizantes*
RNA	ácido ribonucleico*
RT	transcriptasa reversa*
RV	virus recombinantes*
SFB	suero fetal bovino
SIDA	síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TARGA	terapia antirretroviral de gran actividad
VIH -1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
VIH-2	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2
VSV	virus de la estomatitis vesicular*
VSV-ENV-VIH-1	VIH-1 pseudotipado con las proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular

\* Por sus siglas en Inglés.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Proceso de retrotranscripción del VIH-1.....	8
2. Representación esquemática de la dinámica en cuasiespecie.	12
3. Modelo de la glicoproteína de VIH-1 mostrando la localización de los epítomos reconocidos por los bNAbs.....	24
4. Árbol filogenético de la región V3C3 del VIH-1 partir de 135 secuencias de referencia .....	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Clasificación filogenética del VIH-1.....	15
II. Propiedades de neutralización cruzada de un panel de mAbs humanos contra VIH-1.....	19
III. Listado de oligonucleótidos.....	48
IV. Características clínicas de los grupos de pacientes.....	68
V. Perfiles de neutralización de los virus recombinantes incluidos en el panel.....	69
VI. Resultados de los ensayos de neutralización para suero e IgG purificada.....	70
VII. Datos de neutralización ( $ID_{50s}$ ) de los pacientes sin tratamiento, capaces de neutralizar todos los virus del panel.....	71
VIII. Evaluación del método de purificación empleado para aislar la fracción IgG a partir de los sueros que contienen EFV.....	73
IX. Resultados de los ensayos de neutralización, empleando la fracción IgG purificada (0.2 mg/mL), a partir de pacientes capaces de neutralizar todos los virus del panel.....	75
X. Características clínicas de los pacientes que mostraron actividad neutralizante de amplio espectro, asociada a IgG, en una o más muestras tomadas a distintos tiempos.....	77

## RESUMEN

**Introducción.** El interés por redirigir los esfuerzos hacia la generación de una vacuna contra VIH-1 basada en anticuerpos, ha estimulado una serie de estudios a gran escala, enfocados hacia la identificación de pacientes VIH-1<sup>+</sup> que desarrollan una respuesta de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNAbs; del inglés, broadly neutralizing antibodies). Estos estudios están proveyendo información y hallazgos importantes para el futuro desarrollo de una vacuna. Sin embargo, en todos estos estudios se excluye a los pacientes en tratamiento antirretroviral, los cuales tienen un mejor perfil de células B comparado al de pacientes sin tratar. Esta tendencia margina a un numeroso grupo de pacientes con características específicas que podría aportar información importante. Con el fin de estudiar el fenómeno de la inducción de bNAbs en pacientes VIH-1<sup>+</sup> bajo tratamiento antirretroviral, hemos evaluado la amplitud de neutralización viral a partir de muestras de suero de pacientes con y sin tratamiento antirretroviral. **Metodología:** 508 muestras de suero fueron tomadas a partir de un grupo de 364 pacientes VIH-1<sup>+</sup> del hospital clínico de Barcelona. El 47.5% son pacientes bajo tratamiento antiviral (carga viral media: <50 copias/mL; promedio de CD4<sup>+</sup>: 689; promedio de años desde el diagnóstico: 9). El 52.5% son pacientes sin tratamiento (carga viral media: <10,241 copias/mL; promedio de CD4<sup>+</sup>: 567; y promedio de años desde el diagnóstico: 5). La presencia de bNAbs por muestra, se ha determinado mediante ensayos de neutralización contra un panel de 7 virus recombinantes, 5 de los cuales han sido diseñados para expresar la glicoproteína de superficie de aislados primarios de subtipos divergentes. Uno expresa la de una cepa adaptada a laboratorio (control de la neutralización) y el séptimo se añadió al panel como control de la especificidad (de anticuerpos) y se trata de un VIH-1, pseudotipado con la ENV del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Los ensayos de neutralización se realizaron empleando el modelo de infección de la línea celular TZM-bl. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado utilizando dos diluciones de suero (1:200 y 1:2000). Para confirmar la actividad neutralizante IgG-dependiente, se hicieron ensayos de neutralización empleando la IgG altamente purificada a partir de los sueros polireactivos. **Resultados.** Tras evaluar nuestros sueros con cada uno de los virus, se lograron encontrar muestras de pacientes con y sin tratamiento, capaces de neutralizar todos los subtipos representados en el panel. Después se llevaron a cabo ensayos de neutralización utilizando la IgG purificada proveniente de los sueros seleccionados, y se confirmó que la neutralización de amplio espectro está asociada a IgG en el 3.7% de los pacientes con tasas detectables de viremia y en el 1.7% de pacientes con viremia indetectable tratados con antiretrovirales. **Conclusiones:** Hemos confirmado que la inducción de bNAbs es posible en pacientes bajo tratamiento, aún cuando mantienen tasas indetectables de viremia. Estos resultados proporcionan evidencias para justificar la inclusión de pacientes bajo tratamiento, en proyectos de identificación de bNAb y ello, aumentar las posibilidades de encontrar nuevos anticuerpos.

## ABSTRACT

**Introduction.** Recently there have been several studies identifying HIV-infected patients that make a broad neutralizing response and the detailed analyses of their sera have provided valuable information to improve future vaccine design. All these studies had similar sample selection criteria excluding patients on antiretroviral treatment leaving out an important group of patients with specific immunological characteristics. We have screened large numbers of treated and untreated patients for broadly neutralizing antibody (bNAb) response using a new strategy based on the use of recombinant viruses (RVs). **Methodology:** 508 serum samples were screened from 364 patients (173 treated and 191 untreated) for a broadly neutralizing antibody (bNAb) response using a new strategy based on the use of recombinant viruses. Virus stocks were produced by transient transfection and assayed for infectivity with TZM-bl cells. Quantitative neutralization assays were conducted using TZM-bl cells. IgGs were isolated from polyreactive sera with protein G columns and dialyzed. **Results.** Sera able to neutralize a minipanel of 6 recombinant viruses, including envelopes from 5 different subtypes, were found in both groups. After IgG purification, we were able to confirm the presence of IgG-associated broadly neutralizing activity in 3.7% (7 of 191) of untreated patients with detectable viremia and 1.7% (3 of 174) of aviremic patients receiving antiretroviral treatment. **Conclusions:** We thus confirm the possibility of induction of a broad IgG-associated neutralizing response in patients on antiretroviral treatment, despite having undetectable viremia. This observation is in stark contrast to the data obtained from long-term nonprogressors, whose little neutralizing activity has been attributed to the low levels of viral replication.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la identificación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), como el agente patógeno causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), uno de los grandes retos para la inmunología ha sido el desarrollo de una vacuna que prevenga la infección, y que ayude a detener la progresión de la enfermedad (Popovic et al., 1984). Aunque más de 100 ensayos clínicos de fase I, II, y III de diferentes candidatos a vacuna, se han llevado a cabo en todo el mundo, solo unos cuantos de estos han conseguido superar las pruebas de eficacia clínica. Sin embargo, ninguno ha demostrado beneficios suficientes respecto a prevención o control del VIH-1 ([www.iavi.org](http://www.iavi.org)). En otras enfermedades virales tales como polio, influenza, o sarampión, los anticuerpos neutralizantes (NAbs; del inglés, neutralizing antibodies) que se generan como parte de la respuesta inmune ante la infección, o como respuesta a una inmunización mediante vacunación, ejercen un papel protector eficaz (Dayan et al., 2007; Ehrlich et al., 2008; Galli et al., 2009; Nair et al., 2007; Santibanez et al., 2005; Treanor et al., 2006; Valtanen et al., 2000).

A diferencia de otros virus, el VIH es tan altamente variable que ha llegado a ser considerado una de las entidades biológicas que más rápido evolucionan (Wain-Hobson, 1991). Esta alta variabilidad ha dado origen a dos tipos (1 y 2), cuatro grupos de VIH-1 (M, N, O, y P), nueve subtipos (para el grupo M), dos sub-subtipos (uno para el subtipo

A y uno para el subtipo F, ambos del grupo M), y 49 formas recombinantes circulantes (CRFs; del inglés, Circulating Recombinant Forms) generadas a partir de la recombinación entre regiones provenientes de dos o hasta incluso siete distintos subtipos del grupo M. También se ha descubierto que existen formas recombinantes intersubtipo y formas recombinantes únicas (Gao et al., 1996; Delgado et al., 2002; Taylor et al., 2008). Este alto nivel de variabilidad genética del VIH-1, particularmente en las glicoproteínas de superficie (gp120 y gp41), ha sido uno de los principales obstáculos en el desarrollo de una vacuna segura y efectiva. Esta característica resulta aún más desfavorable cuando se trata de generar una vacuna basada en anticuerpos neutralizantes. Además, el VIH-1 tiene otros mecanismos de escape ante el sistema inmune, los cuales contribuyen a evadir la generación de NAbs. Estos mecanismos son: alta glicosilación de las glicoproteínas de superficie, una inestabilidad propia de tales proteínas, y enmascaramiento conformacional de los sitios de unión a receptor (Burton et al., 2004; Kwong et al., 2002; Mascola and Montefiori, 2003).

A pesar de la enorme variabilidad y de los mecanismos de evasión del VIH-1, se ha logrado aislar en forma monoclonal a un número relativamente pequeño de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNAbs; del inglés, broadly neutralizing antibodies), es decir, anticuerpos capaces de neutralizar un amplio y diverso conjunto de variantes virales. Este hallazgo ha provisto una clara evidencia acerca de que una neutralización de amplio espectro (también llamada neutralización cruzada, multi-variante o polireactiva), puede ser alcanzada mediante la acción de anticuerpos individuales (Burton et al., 1991; Burton et al., 1994; Conley et al., 1994; Kessler et al., 1997;



Mascola, 2003; Muster et al., 1993; Trkola et al., 1995; Trkola et al., 1996). Con el descubrimiento de los bNAbs contra VIH-1, surgieron una serie de nuevos enfoques y oportunidades de estudio en la búsqueda de una vacuna basada en anticuerpos. Por una parte, se abrió la oportunidad de caracterizar las respuestas de los NAbs desarrolladas durante la infección por VIH-1. Esto se ha estado intentando llevar a cabo, mediante el estudio de los parámetros clínicos de los pacientes que desarrollan tales respuestas. Con ello, lo que se pretende es identificar y eventualmente obtener provecho de la manipulación de los factores asociados a la generación de bNAbs, en futuras estrategias de inmunización. Por otro lado, al disponer de bNAbs, surgió la oportunidad de identificar y estudiar la estructura de las regiones de las glicoproteínas de superficie donde hacen blanco tales anticuerpos, es decir, zonas de neutralización altamente conservadas (Muster et al., 1993; Trkola et al., 1996; Zwick et al., 2001; Burton et al., 2005). Esto está siendo posible mediante el estudio de los complejos formados entre los bNAbs y sus blancos, a través de técnicas de cristalografía (Pai et al., 2000). Mediante este enfoque, lo que se busca es obtener información para el desarrollo racional de inmunógenos, que sean capaces de generar anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, a través de la vacunación.

Actualmente aun no se ha logrado determinar con precisión cuales son, o si existen o no, los factores asociados con la generación de bNAbs. Además, considerando el tamaño y estructura del complejo gp120/gp41, existe una alta probabilidad de que aun queden por identificar, muchos sitios altamente conservados susceptibles a neutralización por anticuerpos. Todos estos elementos convierten al estudio y búsqueda

de bNAbs contra VIH-1, en uno de los enfoques más prometedores en el campo de la búsqueda de una vacuna. Tanto es así que, en los últimos años se han llevado y se siguen llevando a cabo proyectos muy ambiciosos en torno a este enfoque (Scheid et al., 2009; Li et al., 2009; Corti et al., 2010; Sather et al., 2009).

El elemento central de dichos proyectos gira en torno al hallazgo de nuevos bNAbs, y a la adquisición de nuevos conocimientos para entender la generación de dichos anticuerpos. Por lo tanto, la mayoría de estos proyectos resultan similares en muchos aspectos. No obstante, un factor que resulta invariable en todos estos trabajos es la exclusión de pacientes en tratamiento antirretroviral (ARV) (Scheid et al., 2009; Li et al., 2009; Corti et al., 2010; Sather et al., 2009; Simek et al., 2009; Sajadi et al., 2009). El rechazo de pacientes bajo tratamiento, supone ciertas desventajas en el campo de búsqueda de nuevos bNAbs, ya que se está dejando de lado a un enorme grupo de personas infectadas por VIH-1, quienes en su mayoría mantienen estables las funciones del sistema inmune, y restablecidas a diferentes niveles, gracias al tratamiento.

Son dos las principales razones que hasta ahora se tienen para justificar la exclusión de pacientes en tratamiento en estudios de búsqueda de nuevos bNAbs. La primera, el riesgo a obtener falsos positivos debido a la presencia de un factor neutralizante en las muestras (Dreyer et al., 1999), y la segunda razón es la existencia de publicaciones donde pacientes en tratamiento muestran una nula o muy pobre capacidad de generación de bNAbs (Wainberg et al., 1996; Binley et al., 2000; Morris et al., 1998; Bailey et al., 2006a). La primera razón está absolutamente justificada, sin embargo, como se podrá verificar más adelante en el presente trabajo, y como ya ha sido demostrado en otros

(Dreyer et al., 1999; Bailey et al., 2006a), existen métodos prácticos para superar tal inconveniente. La segunda razón es también justificable, sin embargo, al hacer una revisión de tales publicaciones, salta a la vista que tales trabajos no cuentan con evidencias suficientes para probar tal afirmación. Prueba de ello es que todos estos trabajos tienen en común el uso de un grupo muy pequeño de pacientes. Nuestro trabajo es el primero en su clase en llevar a cabo ensayos de neutralización a gran escala, empleando pacientes con tratamiento. Hemos sido los primeros en demostrar que los pacientes bajo tratamiento antirretroviral, son capaces de generar bNAbs.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Variabilidad del virus**

Poco después de aislarse por primera vez el VIH-1, y a medida de que se iba comprobando que mediante las técnicas de inmunización clásica no se conseguiría una vacuna, era claro que había que definir y conocer a fondo todas las características que hacían tan difícil de combatir a este virus. Una de las más importantes es la alta (y podría decirse, controlada) variabilidad que conduce a la extraordinaria diversidad genética de estos virus. Se conocen cuatro características que en conjunto son responsables del fenómeno variabilidad/diversidad del VIH: un rápido ciclo de replicación, una alta tasa de mutación, recombinogenicidad y la hipermutación mediada por factores virales y celulares.

#### **2.1.1 Velocidad del ciclo de replicación**

En VIH-1, la producción total estimada promedio es de  $\sim 1 \times 10^{10}$  viriones por día, la duración mínima del ciclo de vida, in vivo (que comprende desde la unión al receptor CD4 y correceptores, hasta que comienzan a emerger nuevas partículas virales) es en promedio de 1.2 días, y el promedio de tiempo de generación (definido como el tiempo a partir de que un virus es liberado hasta que este infecta otra célula y

causa la liberación de una nueva generación de partículas virales) es de 2.6 días (Perelson et al., 1996).

### **2.1.2 Tasa de mutación**

La transcriptasa reversa (RT; del inglés, reverse transcriptase) del VIH-1 es la enzima encargada de la replicación del RNA genómico (gRNA; del inglés genomic RNA). Durante el proceso de replicación, se genera un heteroduplex RNA/DNA transitorio, a su vez, la actividad catalítica RNasa H de la RT va degradando el RNA, y finalmente polimeriza sobre el molde de DNA hasta formar una doble cadena de DNA. Esta doble cadena de DNA será integrada en el DNA genómico de la célula huésped (Figura 1F). La fidelidad de polimerización de la RT de VIH-1 es de aproximadamente 1 error por cada 2000-5000 nucleótidos polimerizados (Roberts et al., 1988; Ricchetti and Buc, 1990; Preston et al., 1988; Mansky and Temin, 1995). A diferencia de otras RTs, esta no tiene dominio de exonucleasa y por lo tanto carece de la función de lectura y corrección de errores, es decir que las alineaciones de nucleótidos no coincidentes, son siempre pasadas por alto durante el curso de la replicación. Existen evidencias que apuntan a que los errores de replicación ocurren durante los dos ciclos de síntesis de DNA, es decir que los errores ocurren tanto cuando se emplea como molde al RNA, como cuando usa la cadena de DNA recién sintetizada (Mansky and Temin, 1995), por lo tanto, la tasa de error va desde 5 a 10 mutaciones por cada ciclo. Las mutaciones más comunes son las de sustitución y las de cambio del marco de lectura. Para las de sustitución, se ha descrito que en la mayoría de los casos ocurren

sustituciones en donde se cambian guanina por adenina y citosina por timina. Para el caso de mutaciones de cambio de marco de lectura se ha descrito que esto ocurre principalmente por la pérdida de una base en series de T's y A's (Mansky and Temin, 1995).

### **2.1.3 Recombinación**

El fenómeno de recombinación en los retrovirus se debe propiamente, a su maquinaria de replicación. Estos virus son naturalmente propensos a la recombinación debido a que contienen dos copias de gRNA de cadena sencilla y polaridad positiva en cada virión y durante el proceso de síntesis del provirus, la RT necesita ejecutar dos translocaciones (o saltos de molde) mecánicamente similares a través de las dos cadenas (Figura 1B y 1E) (Temin, 1993; Coffin, 1979). No obstante de albergar dos genomas por partícula, los retrovirus no son propiamente diploides, sin embargo pueden ser descritos como pseudodiploides. Se ha demostrado que los dos gRNAs forman un dímero mediante interacciones no covalentes cercanas al extremo 5' de los genomas (Kung et al., 1975; Kung et al., 1976). Esta estrecha proximidad entre cadenas de gRNA, es responsable de que el surgimiento de un genoma recombinante resulte solo durante la infección de un virus que previamente ha empaquetado genomas procedentes de virus distintos durante una co-infección previa (Hu et al., 2003). Es decir que, después de que una célula haya sido coinfectada por dos o más virus distintos, la progenie será una mezcla de viriones que albergan genomas compuestos tanto de homodímeros como heterodímeros de gRNA, pero no habrá recombinación de genomas

hasta después de que los viriones resultantes que porten heterodímeros de gRNA, infecten una nueva célula (Hu et al., 2003). Es importante destacar que en VIH-1, la tasa de formación de viriones con genomas heterólogos (durante coinfecciones) es más alta si se compara con otros retrovirus. La causa de esto reside en que para VIH-1, el gRNA parece dimerizar en el citoplasma, lo cual favorecería una asociación aleatoria de genomas. Esto no ocurre en otros virus como el de la leucemia murina que dimeriza antes de salir del núcleo (Flynn et al., 2004; Flynn and Telesnitsky, 2006; Kharytonchyk et al., 2005; Zhuang et al., 2006).

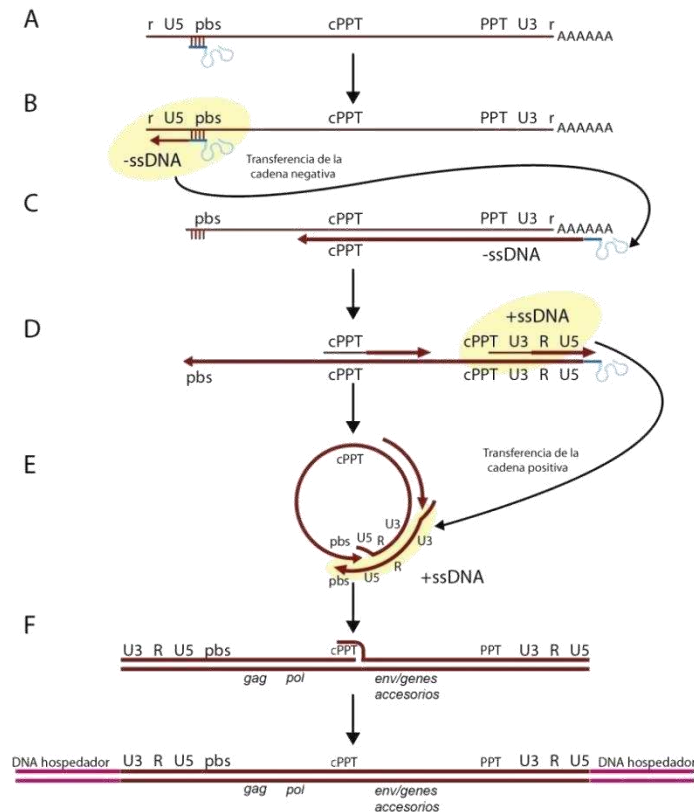


Figura1. Proceso de retrotranscripción del VIH-1. (A) Unión de un iniciador tRNA a sus secuencias complementarias en el sitio de unión a iniciador (pbs: del inglés primer binding site) cercano al extremo 5' del gRNA, una vez que este iniciador ha unido, comienza la síntesis de una parte de la cadena negativa de DNA la cual termina cuando se alcanza el extremo 5' del gRNA, generando lo que se conoce como "DNA de desemboque de la cadena negativa" (-ssDNA: del inglés, minus-strand strong-stop DNA), este fragmento de DNA contiene las secuencias r y U5 de las repeticiones terminales largas (LTR: del inglés long terminal repeats). (B) Una vez sintetizado el -ssDNA, este es liberado mediante la acción de la RNasa H que degrada el RNA complementario, y es aquí cuando ocurre el primer salto replicativo, ya que el -ssDNA es transferido hasta el extremo 3' del gRNA. (C) La síntesis de la cadena negativa de DNA continúa ahora desde el extremo 3' del gRNA; gracias a esta acción se completa el primero de los dos LTRs ya que al extremo 3' se encuentran las secuencias U3 y r. (D) En tanto la síntesis de la cadena negativa de DNA procede y la acción RNasa H va eliminando la cadena positiva de gRNA, la síntesis de la cadena positiva de DNA es iniciada a partir de oligonucleótidos que persisten en las regiones conocidas como trectos de polipurina (PPT: del inglés, polypurine tract), uno de estos PPTs se encuentra al inicio de la región U3 del gRNA por lo que la síntesis iniciada a partir de esta región (la cual concluye al alcanzar el extremo 3'), genera el "DNA de desemboque de la cadena negativa" (+ssDNA: del inglés, plus-strand strong-stop DNA); (E) A continuación, la RNasa H elimina el iniciador tRNA que permanecía unido al extremo 5' la cadena negativa de DNA, dejando libre una pequeña secuencia del +ssDNA recientemente formado, la cual es complementaria con la secuencia del extremo 3' de la cadena negativa de DNA "salta" para alinearse con el +ssDNA y continuar la síntesis, gracias a esto se completa el segundo LTR. (F) Lo que en un momento era el +ssDNA pasa a convertirse en el extremo 5' de la cadena positiva de DNA, proveyendo de un extremo 3' para continuar con la síntesis de la misma cadena; una región PPT que se encuentra en el centro de la secuencia también provee de un sitio de unión de oligonucleótidos por lo tanto la síntesis de la cadena positiva de DNA procede a partir de dos puntos generando al final una doble cadena de DNA con dos LTRs y una región solapada en el PPT central. (G) Finalmente la integrasa cataliza el establecimiento del provirus y enzimas del hospedador reparan tanto regiones solapadas como huecos en la secuencia. Las líneas rojas delgadas representan al RNA viral, y las más gruesas al DNA viral. Los tRNAs iniciadores se muestran como figuras en color verde. (La información no está a escala).



Existen dos tipos de saltos de molde por parte de la RT durante la replicación de los retrovirus: saltos replicativos y saltos recombinogénicos. En contraste con lo que ocurre con los saltos en los ssDNAs (replicativos) (Figura 1B y 1E), los cuales ocurren exclusivamente en posiciones definidas, los saltos recombinogénicos pueden ocurrir en cualquier posición del genoma retroviral (An and Telesnitsky, 2002), con una frecuencia destacable de aproximadamente cada 2 kb o posiblemente incluso más bajo algunas condiciones fisiológicas (An and Telesnitsky, 2002; Rhodes et al., 2003; Chen et al., 2006). Actualmente se carece de un entendimiento estructural definitivo acerca de como la RT reconoce, se incorpora y se libera de las cadenas molde, y de cómo completa la recombinación, lo cual representa un campo que requiere de mucho esfuerzo en investigación (Onafuwa-Nuga and Telesnitsky, 2009).

#### **2.1.4 Hipermutación mediada por factores virales y celulares**

El fenómeno de la hipermutación en VIH-1 se basa en el cambio de G's por A's (Harris et al., 2003; Mangeat et al., 2003). Ocurre a partir del efecto combinado de la acción de factores virales y celulares. Por parte de la célula están las proteínas APOBEC, que son una familia de polinucleótido citidin-deaminasas, y por parte del virus participa la proteína Vif. Para comprender como las proteínas APOBEC contribuyen al fenómeno de la hipermutación es necesario entender primero la función de estas proteínas y su relación con Vif. Dos miembros de la familia APOBEC, la variantes 3G y 3F (APOBEC3G/F para resumir), son dos potentes inhibidores de la infección de VIH-1. Las APOBEC3G/F tienen capacidad de unión a RNA y por lo tanto

pueden ser encapsuladas junto al RNA genómico y el resto de las proteínas de la nucleocápside durante la generación viral. Las APOBEC3G/F dirigen una deaminación intensiva de citidinas resultando en su conversión a uridinas, lo cual quedará registrado como cambios de guanosina por adenosina en la cadena positiva del cDNA. En adición a esta profunda modificación de la integridad del genoma viral, APOBEC3G/F también parece inhibir la síntesis de DNA impidiendo la translocación de la RT a través del molde de RNA. Durante una infección por VIH-1, la acción de APOBEC3G/F es extensamente limitada mediante la acción de la proteína viral Vif, la cual induce la poliubiquitinación y la subsiguiente degradación proteosómica de las APOBEC3G/F, controlando así, su incorporación a las partículas virales (Kobayashi et al., 2005). Por lo tanto, las funciones de las proteínas Vif y APOBEC3G/F son antagónicas. Este y otros recientes hallazgos apuntan a que el fenómeno de la hipermutación se debe a las fluctuaciones en el balance Vif–APOBEC (Malim, 2009).

## **2.2 Variabilidad intrapaciente: estructura en cuasiespecie**

El efecto en conjunto de los factores responsables de las modificaciones en la secuencia del VIH sumado a su rápido ciclo de generación, tiene como consecuencia el que este virus esté catalogado entre las entidades conocidas que más rápido evolucionan. Dos medidas han sido usadas para describir cuantitativamente la evolución del VIH-1, la primera es la diversidad, descrita como la variación genética a un tiempo dado, y la segunda es la divergencia, que se refiera a la distancia genética entre un punto de referencia, usualmente el virus precursor (Lee et al., 2008).

La diversidad de secuencia de VIH dentro de un individuo evoluciona como poblaciones altamente heterogéneas que contienen partículas estrechamente relacionadas, pero con genomas no idénticos. La diversidad de secuencia de VIH por individuo puede llegar hasta un ~5% (en el gen *env*) en unos cuantos años y la divergencia a partir de la cepa inicial incrementa ~1% por año (Shankarappa et al., 1999). Estas complejas estructuras de población son llamadas “cuasiespecies virales” (Domingo and Holland, 1997). La dinámica de las cuasiespecies está caracterizada por procesos continuos de generación de mutantes, competición y selección, resultando en el dominio de aquellos genomas más adaptados, rodeados de un espectro de mutantes (Domingo and Holland, 1997) como se muestra en la Figura 2. La estructura de cuasiespecie y las grandes poblaciones virales permiten a los virus de RNA y en especial al VIH, reaccionar rápidamente ante presiones selectivas ejercidas tanto por el sistema inmune del individuo, como por la administración de drogas antivirales o anticuerpos monoclonales (Domingo and Holland, 1997).

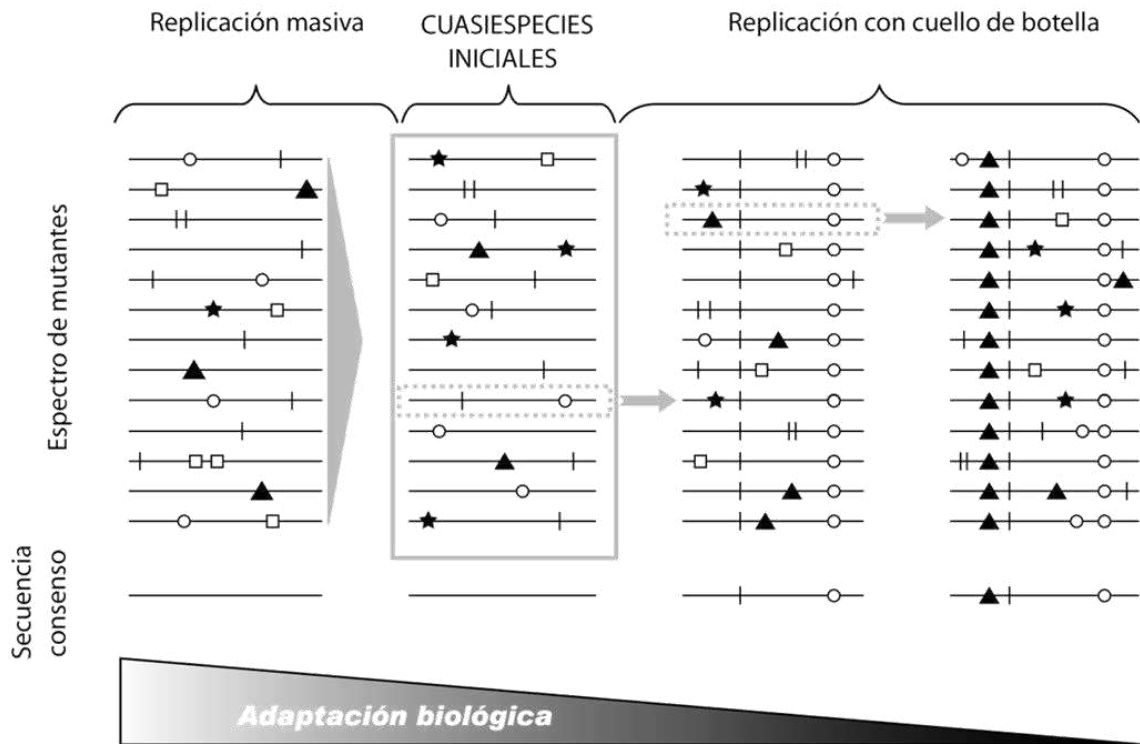


Figura 2. Representación esquemática de la dinámica en cuasiespecie. Los genomas individuales dentro de un espectro de mutantes son mostrados como líneas horizontales, y las diferentes mutaciones como símbolos sobre las líneas. La secuencia consenso o promedio muestra el nucleótido más abundante en cada posición. El efecto del régimen de replicación sobre la variación de la eficacia biológica o “fitness”, se muestra de la siguiente manera: el triángulo grande representa un replicación intensa de la población de cuasiespecies (equivalente a un pase poblacional grande in vitro) que origina otras nuevas cuasiespecies y generalmente resulta en el incremento de la adaptación biológica; las flechas pequeñas indican pasos de replicación con cuellos de botella consecutivos (equivalente a transferencias placa a placa in vitro) que resultan en el establecimiento de las mutaciones presentes en el genoma parental y están usualmente acompañadas por una disminución de la adaptación biológica. La replicación en cuello de botella es producido in vivo cuando una presión selectiva (p.ej. en la forma del tratamiento antiviral) es aplicada sobre las cuasiespecies (p.ej. de VIH-1), haciendo detectables las mutaciones de resistencia a drogas en la secuencia consenso del virus (Briones and Domingo, 2008).

## 2.3 Tipos, subtipos y formas recombinantes: caracterización biológica y aislamiento

### 2.3.1 Clasificación

Como ya se ha mencionado antes, existen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. Estos virus comparten entre 40 y 50% de homología genética, una importante reactividad cruzada para los productos genéticos estructurales, tropismo celular y similar

organización genética. Ambos tipos son transmitidos mediante contacto sexual, a través de la sangre y de madre a hijo. La infección por estos virus causa SIDA clínicamente indistinguible uno del otro, sin embargo, VIH-2 es transmitido menos fácilmente (principalmente en transmisiones sexuales y perinatales), y el período entre la infección inicial y el desarrollo de la enfermedad es más largo en el caso del VIH-2 (entre 5 y 15% de los infectados por VIH-1 encajan en la definición de 'no progresor a largo plazo', y lo mismo para entre el 86 y 95% de los infectados por VIH-2) (Kanki, 1999).

El VIH-2 está concentrado en el oeste de África aunque es raramente encontrado en otras partes. Este virus está dividido en siete subtipos (A-G) pero solo los subtipos A y B son prevalentes (Plantier et al., 2004). El VIH-2 representa menos del 1% de las infecciones por VIH a nivel mundial por lo que hablar de infección por VIH es casi sinónimo de infección por VIH-1.

El VIH-1 por su parte, al ser el principal responsable de las infecciones a nivel mundial ha sido sujeto de intenso estudio incluyendo su origen y clasificación. Actualmente los virus de VIH-1 están clasificados en cuatro grupos filogenéticos: M (main), O (outlier), N (nonmajor/nonoutlier) y un recientemente identificado grupo P, los cuales probablemente reflejan cuatro eventos independientes de transmisión a través de especies a partir del chimpancé (Plantier et al., 2009; Gao et al., 1999; Robertson et al., 2000).

El grupo O parece estar restringido a oeste y centro de África. El grupo N, descubierto en 1998 en Camerún, es extremadamente raro. El grupo P, fue aislado de una mujer de Camerún en 2009, y se está a la espera de confirmar nuevos casos, ya que el individuo declaró no haber tenido contacto cercano con primates (Plantier et al., 2009).

El grupo M es el responsable de más del 90% de las infecciones por VIH-1 a nivel mundial. Este grupo ha sido dividido en subtipos, denotados con letras y sub-subtipos denotados con números. Los subtipos y sub-subtipos A1, A2, A3, A4, B (Rivera-Morales et al., 2001), C (Rivera-Morales et al., 2011), D, F1, F2, G, H, J, y K están actualmente reconocidos. Los subtipos de VIH-1 son cepas filogenéticamente vinculadas que están aproximadamente a la misma distancia genética unas con otras; en algunos casos, los subtipos están también vinculados geográficamente o epidemiológicamente. La variación genética dentro de un subtipo puede ser del 15 al 20%, mientras que la variación entre subtipos es usualmente del 25 al 35% (Hemelaar et al., 2006).

Ocasionalmente, dos o más virus divergentes pueden encontrarse dentro de una célula de una persona infectada y mezclar su material genético para crear un virus híbrido (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Muchas de estas nuevas cepas no sobreviven por mucho tiempo, pero aquellas que logran infectar y son identificadas en tres o más personas que no tienen relación epidemiológica, son conocidas como “formas recombinantes circulantes” (CRFs: del inglés, circulating

recombinant forms); por el contrario, cuando un cepa es identificada en más de dos personas, relacionadas epidemiológicamente, estas cepas son llamadas “formas recombinantes únicas” (URFs) (Tabla I).

**Tabla I.** Clasificación filogenética del VIH-1 (Taylor et al., 2008)

Clasificación	Definición	Ejemplos
Subtipos o Cladas	Cepas de VIH-1 genéticamente relacionadas entre sí pero que en esencia, son filogenéticamente equidistantes; generan una filogenia tipo estrella en lugar del tipo árbol	Actualmente se conocen los subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, y K; de A a B son altamente prevalentes, el resto tienen una prevalencia baja y están limitados a distribuciones geográficas.
Sub-subtipos	Distintos linajes dentro de un subtipo; la distancia genética entre sub-subtipos es más pequeña que entre subtipos	Los subtipos A y F están subdivididos en sub-subtipos de A1 a A4 y de F1 a F2, respectivamente; principalmente circulan en el centro y oeste de África
Formas recombinantes intersubtipo	Cepas mosaico con segmentos de dos o más subtipos alternando a través del genoma.	Comunes en epidemias donde circulan varios subtipos; se cree que resultan de la infección de una persona con más de un subtipo de VIH-1
Formas recombinantes circulantes	Formas recombinantes específicas que están esparcidas en una población; las nuevas formas quedan definidas cuando se aíslan de tres personas sin vínculos epidemiológicos directos	Actualmente hay 49 formas descritas para VIH-1 y 1 para VIH-2; las CRF01_AE y CRF02_AG se encuentran principalmente en el sureste asiático y el oeste de África, respectivamente; otros tienen distribuciones más limitadas
Formas recombinantes únicas	Formas recombinantes intersubtipo aisladas de un solo individuo	Cientos de formas han sido descritas basadas en secuencias de genomas parciales o completos; su potencial para desencadenar una epidemia es desconocida
Linajes geográficamente distintos	Linajes, a menudo específicos de país, que son distinguibles filogenéticamente; a diferencia de los subtipos, estos no son filogenéticamente equidistantes dentro de subtipos	B de Tailandia, C de la India, D del este y oeste de África, y A (FSU-A) de la antigua Unión Soviética

## 2.4 La variabilidad como factor en la búsqueda de una cura

Muy pronto al comienzo de la epidemia de SIDA ya había indicios acerca de que los virus de la inmunodeficiencia humana no serían fáciles de combatir. A solo dos años después de que se aislara por primera vez el VIH tipo 1 en 1985 (Barre-Sinoussi et al., 1983), ya podía distinguirse un segundo tipo de VIH circulando en las poblaciones humanas (Barin et al., 1985). Así mismo, se sumaban estudios que desde 1984 ya daban a conocer diferencias en el patrón de restricción enzimática en secuencias de VIH-1 aisladas de pacientes con SIDA o ‘en riesgo de padecerlo’ (Benn et al., 1985; Shaw et

al., 1984; Wong-Staal et al., 1985) (así catalogados entonces). Enseguida llegaron los primeros análisis de secuencia del VIH-1 con resultados que confirmaban la alta variabilidad de este virus (Alizon et al., 1986; Hahn et al., 1986) y con estos, los también primeros ensayos de inmunización en animales empleando como antígeno a la glicoproteína de superficie gp120. En estos experimentos de inmunización se vio por primera vez, que la alta variabilidad del virus provoca tal diversidad, que los anticuerpos generados de esta manera siempre serían capaces de unirse, y en el mejor de los casos, neutralizar (in vitro), únicamente al aislado que les dio origen o a aquellos cuya secuencia fuese muy similar (Robey et al., 1986; Nara et al., 1988; Palker et al., 1988). Muy pronto quedó claro que los anticuerpos generados de esta manera resultarían inútiles frente a virus heterólogos, puesto que no serán capaces de reconocerlo (Matthews et al., 1987; Berman et al., 1988; Hu et al., 1987).

Los intentos para conferir inmunidad humoral y celular en modelos animales habían mejorado el entendimiento de la patogénesis del VIH-1, pero no habían dejado buenos antecedentes en lo que a protección se refiere. En 1987 se hizo público el fracaso de una vacuna experimental en chimpancés (Fultz et al., 1987), pero aun así, ante la urgencia de encontrar soluciones para un enorme problema de salud, en ese mismo año, Estados Unidos inició el reclutamiento de voluntarios para llevar a cabo el primero de muchos ensayos clínicos de fase I y II. Inicialmente se emplearon dos proteínas recombinantes de la gp120 (Keefer et al., 1997) desarrolladas por la empresa de biotecnología MicroGeneSys. Sin embargo, en 1995 ya se daba a conocer el primer individuo inmunizado que resultaba infectado. Tres años después el número de



infectados ascendía a 20 en un estudio de 596 participantes (Connor et al., 1998; Kahn et al., 1995; McElrath et al., 1996), y la respuesta de anticuerpos tipo-específica observada, ya dejaba claro que esta estrategia no cumpliría más allá del objetivo de evaluar la seguridad en su aplicación (Connor et al., 1998).

Después vendrían más ensayos empleando diseño de antígenos, así como también diversos y novedosos métodos de presentación de los mismos (<http://www.iavi.org>), entre los que se incluían estrategias dirigidas a estimular la inmunidad celular. Fue en estos estudios donde por primera vez se lograron éxitos en lo que a reactividad cruzada se refiere, puesto que nunca hasta entonces se había conseguido generar respuesta de CTLs capaces de lisar células CD4<sup>+</sup> autólogas infectadas con aislados primarios filogenéticamente distantes (Ferrari et al., 1997). Sin embargo, en estos y otros estudios (Kaslow et al., 1996) ya se reconocía al haplotipo de los antígenos leucocitarios humanos (HLA; del inglés, human leukocyte antigen), como el factor determinante de amplitud de respuesta de CTLs y que salvo algunas excepciones (Kaslow et al., 1996; Goulder et al., 1996; Klein et al., 1998), el VIH-1 escaparía más fácilmente a la presión inmunológica mutando los epítomos reconocidos por el HLA (McMichael and Phillips, 1997).

Desde los primeros estudios de variabilidad del VIH-1 a mediados de los 80, ya se observaba que los virus en cultivo mantienen su secuencia en un estado relativamente estable (Wong-Staal et al., 1985). A medida en que se fueron adquiriendo conocimientos, se confirmó, que la aparición de mutantes resistentes responde a la

presión ejercida por el sistema inmune. Así mismo, al conocerse la extraordinaria variabilidad de este virus, y mediante antecedentes experimentales, quedó claro que dicha presión resulta inútil ante un virus de tales características, puesto que un virus tan altamente variable sería siempre capaz de superar en velocidad, a los procesos naturales de selección y maduración de los dos flancos de la respuesta inmune. Ya se daba por hecho que el virus siempre llevaría la ventaja ante el sistema inmune, sin embargo, el virus mostró nuevamente su gran capacidad de adaptación con la llegada de las drogas antivirales y sus primeras pruebas en humanos en 1986 (Larder et al., 1989; Yarchoan and Broder, 1987; Yarchoan et al., 1987), ya que a solo dos años de que se iniciara su uso general en el tratamiento contra el SIDA (Fischl et al., 1987), ya aparecían publicaciones describiendo reducción en sensibilidad y mutaciones de resistencia (Larder et al., 1989; Larder and Kemp, 1989; Rooke et al., 1989).

Fue quizás a partir del 2003 cuando comenzó a aceptarse de manera general que, mediante enfoques puramente empíricos, no se lograría generar una vacuna contra VIH-1. En ese año se hicieron públicos los datos preliminares de los dos ensayos de fase III de la empresa VaxGen, en donde se empleó al candidato a vacuna AIDSVAX, conteniendo básicamente una versión genéticamente modificada de la proteína de superficie del VIH (2003). Estos resultados tuvieron una fuerte repercusión ya que evidenciaban el fracaso del primer ensayo de eficacia de fase III, en el cual participaron alrededor de 7,900 voluntarios de EE UU, Canadá, Holanda, Puerto Rico y Tailandia. Cuatro años más tarde, se hizo público un nuevo fracaso, el de la prueba STEP. Esta prueba empleó el candidato a vacuna MRKAd5 de Merck (Buchbinder et al., 2008)

inicialmente en 3,000 voluntarios. Estos y otros resultados (Rerks-Ngarm et al., 2009) dejaron claro que definitivamente sería necesario dirigir los esfuerzos hacia el desarrollo racional de antígenos.

### **2.5 Los Anticuerpos Neutralizantes de Amplio Espectro como herramientas para el diseño racional de antígenos**

En el campo de vacunas contra VIH-1, surgieron proyectos involucrando el concepto de diseño de antígenos (Kilby et al., 1998). Sin embargo, no fue hasta el aislamiento (monoclonal) de los primeros bNAbs, cuando por fin se logró contar con una herramienta que ofrecía verdaderas pautas para un diseño racional de antígenos. La neutralización de VIH-1 por anticuerpos era un fenómeno ampliamente conocido, así como también lo eran las estrategias que el virus había desarrollado para hacer que comúnmente, la neutralización fuese específica hacia un grupo de variantes del virus. Se sabía pues, que el virus tenía muchos mecanismos de defensa pero pocas vulnerabilidades (Wyatt and Sodroski, 1998), sobre todo para las glicoproteínas de superficie. Sin embargo, esas vulnerabilidades de las glicoproteínas de superficie se han ido exponiendo gracias al descubrimiento de los bNAbs (Tabla II), capaces de neutralizar a múltiples aislados primarios, y con ello dando origen al concepto de “polireactividad” o neutralización de amplio espectro.

**Tabla II.** Propiedades de neutralización cruzada de un panel de mAbs humanos contra VIH-1 (Burton et al., 2004).

Virus	b12	b6	2G12	447-52-D	58.2	X5	2F5	4E10
Subtipo B (total = 30)	22(73%)	5(17%)	22(73%)	14(47%)	10(33%)	3(33%)	24(80%)	30(100%)
Todos los subtipos (total = 90)	45(50%)	5(6%)	37(41%)	17(19%)	10(11%)	3(3%)	60(67%)	90(100%)

La neutralización fue considerada positiva, si el 50% de la neutralización fue alcanzada a una concentración de mAb de menos de 50 $\mu$ g/mL, en un ensayo de neutralización con pseudovirus, clasificado como relativamente sensible. b6 es un mAb relativamente convencional dirigido contra el sitio de unión a CD4; 58.2 es un mAb contra el lazo V3; X5 es un mAb dirigido contra epítomos inducidos por CD4 (CD4i Abs; del inglés, CD4 induced antibodies); el resto de los mAbs son descritos a detalle en el texto.

### 2.5.1 Origen de los bNAbs

Lo que inicialmente condujo a los investigadores a intentar aislar anticuerpos neutralizantes, fueron las crecientes evidencias experimentales donde la inmunización pasiva se perfilaba como una estrategia alternativa para el tratamiento y profilaxis de la enfermedad. En 1988, dos grupos describieron beneficios clínicos en pacientes con SIDA quienes recibieron plasma de donadores VIH-1<sup>+</sup> asintomáticos (Jackson et al., 1988). En estos casos, se sabía que el plasma contenía altos títulos neutralizantes anti-VIH-1. Entre 1989 y 1991, otros dos grupos publicaron que, la presencia (en hijos) de anticuerpos maternos contra epítomos seleccionados de la gp120, mantenía una fuerte correlación con el fallo en la trasmisión del virus a través de madres infectadas hacia los hijos (Rossi et al., 1989; Goedert et al., 1989; Devash et al., 1990). Resultados exitosos de inmunización pasiva en animales también contribuyeron a reforzar los hallazgos en humanos (Emini et al., 1990; Putkonen et al., 1991). Todo ello

sirvió como antecedente para iniciar búsqueda de anticuerpos monoclonales con el objetivo de verificar si tales efectos podrían depender de especificidades individuales.

El primero de los anticuerpos monoclonales (mAbs: del inglés, monoclonal antibodies) neutralizantes de amplio espectro en ser identificado fue b12 (Burton et al., 1991; Barbas, III et al., 1992). Fue aislado en 1991, a partir de un panel de fragmentos Fab (del inglés, fragment antigen binding) generados contra la gp120, mediante la técnica de despliegue en fago. La biblioteca de Fab fue generada a partir de la médula ósea de un individuo asintomático que había sido positivo para VIH-1 durante 6 años (Burton et al., 1991). A partir de entonces, diversos grupos se sumaron a la búsqueda de bNAbs y las técnicas para aislar estos anticuerpos se diversificaron para hacer el proceso más eficiente. A pesar de que surgieron proyectos intentando aislar este tipo de anticuerpos a partir de diversas fuentes (bibliotecas sintéticas de fagos o a partir de modelos animales), hasta ahora, los individuos infectados por VIH-1 han prevalecido como fuente principal para la búsqueda.

### **2.5.2 Vulnerabilidades de la ENV debido a los bNAbs**

Actualmente se ha aislado un número relativamente pequeño de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, sin embargo, han sido muy útiles para descubrir vulnerabilidades del VIH-1 al mismo tiempo que han ayudado a comprender ciertos mecanismos de acción de las glicoproteínas de superficie, los cuales son

determinantes para el proceso de infección. A continuación se describen algunos aspectos destacados de los bNAbs más estudiados en el presente.

### **2.5.2.1 b12**

b12 es un anticuerpo que obstruye el sitio de unión a CD4 en la gp120, previniendo su anclaje. Un elemento clave del sitio de unión a CD4, es un hueco que forma un sitio de contacto para el aminoácido Phe-43 que se proyecta desde un lazo en CD4 (Wyatt and Sodroski, 1998). Sin esta interacción, gp120 se une muy débilmente a CD4 para que la fusión proceda eficientemente. La estructura cristalina de b12 muestra que este anticuerpo tiene un lazo CDR3 inusualmente largo, el cual puede clavarse dentro del “hueco” que forma el sitio de unión a CD4 de la gp120 (Saphire et al., 2001).

### **2.5.2.2 2F5 y 4E10**

Los mAbs 2F5 y 4E10 reconocen epítomos cercanos aunque distintos en la región externa próxima a la membrana (MPER; del inglés, membrane proximal external region) en el ectodominio de la gp41 (Zwick et al., 2001). Hasta ahora, MPER es una de las pocas regiones conocidas que permiten el acceso a anticuerpos en la gp41, ya que la mayoría de su superficie esta oculta por gp120 (Zwick et al., 2001), no obstante, podrían haber aún más sitios por descubrir. Diferentes estudios de afinidad empleando péptidos, sugieren que estos anticuerpos han evolucionado para reconocer secuencias en contextos muy especializados cuando se encuentran formando

parte de la molécula. Estudios cristalográficos empleando 2F5, han demostrado que su epítipo adopta una estructura llamada giro beta ( $\beta$ -turn) (Ofek et al., 2004). Por su parte, el epítipo de 4E10 adopta una conformación elíptica cuando se encuentra en complejo con el anticuerpo (Cardoso et al., 2005). Se sabe que estos anticuerpos no interfieren con la unión a receptor pero que actúan inhibiendo el proceso de fusión.

### **2.5.2.3 447-52D**

El anticuerpo 447-52D neutraliza un amplio rango de aislados que contienen la secuencia GPGR en la punta del asa V3 (variable 3) en gp120 (Gorny et al., 1992; Zolla-Pazner et al., 2004). Como su nombre lo indica, el lazo V3 varía en secuencia entre diferentes aislados de VIH. La estructura cristalina del 447-52D en complejo con péptidos del asaV3, ha revelado que este tipo de anticuerpos han evolucionado para ser capaces de reconocer a un pequeño núcleo peptídico y a la vez, ser capaces de soportar variaciones a ambos extremos de dicha secuencia (Stanfield et al., 2004). Un ejemplo de un caso parecido y ampliamente estudiado es el Complejo Humano Mayor de Histocompatibilidad tipo I y II, que interactúan con los átomos de la cadena principal en combinación con una secuencia conservada de residuos de aminoácidos (Kwong, 2004). Existe evidencia que apunta a que la razón por la cual la secuencia GPGR está relativamente conservada, se debe a que desempeña un papel importante en la unión al correceptor (Hartley et al., 2005).

#### **2.5.2.4 2G12**

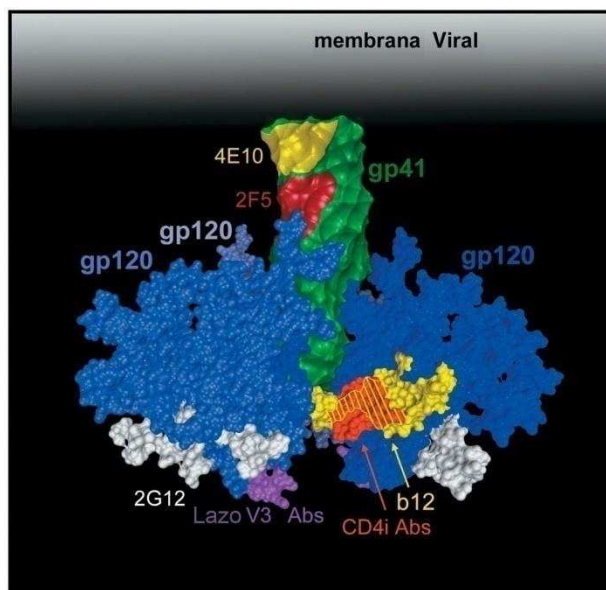
Otro de los anticuerpos monoclonales más estudiados es 2G12. A diferencia de la mayoría de los anticuerpos, 2G12 no conserva la forma tradicional de “Y”, sino que, mantiene sus dos brazos apuntando verticalmente uno al lado del otro. Esto permite que exista un intercambio de dominios entre las cadenas pesadas, generando con ello un sitio de unión adicional. Este particular arreglo le permite reconocer a un grupo de residuos de oligomanosa que forman parte de la capa protectora de azúcar de la gp120 (Calarese et al., 2003). Excepcionalmente, este anticuerpo se ha generado en contra de la primera línea de defensa del virus. El estado particularmente conservado de este particular grupo de glicanos permite al 2G12, reconocer muchas cepas de VIH-1. Una vez que este anticuerpo se ha unido, su masa interfiere de forma no específica con la entrada del virus.

#### **2.5.3 Estrategias para el diseño de inmunógenos mediante los bNAbs**

Los bNAbs son una clara demostración de que el sistema inmune es capaz de generar especificidades dirigidas hacia los puntos débiles del virus (Figura 3). Si a ello se suman las evidencias experimentales en donde se muestran resultados favorables respecto a prevención de la infección, gracias a la preexistencia de este tipo de anticuerpos (Hessell et al., 2009), resulta lógico, a la vez que esperanzador, enfocar esfuerzos en el diseño de inmunógenos que sean capaces de generar este tipo de



especificidades. Actualmente existen cuatro estrategias bien definidas que hacen uso, a distintos niveles, de lo que hasta ahora se ha aprendido a través de los bNAbs.



**Figura 3.** Modelo de la glicoproteína de VIH-1 mostrando la localización de los epítomos reconocidos por los bNAbs. Los tres monómeros de gp120 constituyendo el trímero ENV, están representados en azul. La representación de gp41 en verde, es esquemática. Es muy probable que los epítomos para 4E10 y 2F5 en amarillo y rojo respectivamente, no estén disponibles y esquemáticamente visibles, hasta que la espícula de Env haya interactuado con los receptores celulares. CD4i Abs se refiere a regiones aproximadas donde se forman epítomos inducidos por CD4, el lazo V3 es la región donde hacen blanco anticuerpos tales como 447-52D.

### 2.5.3.1 Producción de moléculas que mimetizan el trímero maduro en la superficie del virión

Estas moléculas pueden ser recombinantes o expresadas en la superficie de partículas tales como pseudoviriones o proteoliposomas (Sanders et al., 2002; Yang et al., 2001; Grundner et al., 2002). El grado de mimetismo puede ser estimado usando a los propios mAbs.

### **2.5.3.2 Producción de glicoproteínas de superficie diseñadas para presentar a los epítomos neutralizantes más eficientemente que en su estado natural**

La eliminación tanto de asas variables como de los sitios de unión a carbohidratos, son enfoques estimables. Un enfoque alternativo resulta de intentar reducir la inmunogenicidad de epítomos irrelevantes mediante, por ejemplo, hiperglicosilación o mutación, para intentar enfocar las respuestas hacia los epítomos de interés (Pantophlet et al., 2003).

### **2.5.3.3 Generación de intermediarios estables del proceso de entrada**

La tercera estrategia es generar intermediarios estables del proceso de entrada, con el propósito de exponer epítomos conservados a los cuales los anticuerpos podrían tener acceso durante la entrada. La inmunización con la gp120 ligada a CD4, lo cual ha generado NAbs en conejos, es un ejemplo de este enfoque (Fouts et al., 2002). Sin embargo, no está claro que porción de esos NAbs están dirigidos a CD4. El uso de péptidos que mimeticen a CD4 en lugar de usar a la propia molécula, es un posible método alterno que se está estudiando.

#### **2.5.3.4 Producción de epítomos que mimeticen a los de los mAbs**

Se trata de producir epítomos que mimeticen a los de los mAbs, a partir de estudios de estructura analizando complejos antígeno-anticuerpo. Este enfoque ha sido ampliamente estudiado mediante el uso de péptidos para 2F5 y 4E10, y mediante el uso de estructuras de carbohidratos para 2G12.

#### **2.5.4 Búsqueda y estudio de nuevos Anticuerpos Neutralizantes de Amplio Espectro**

Todas las estrategias para el diseño de antígenos, anteriormente mencionadas, están siendo extensamente estudiadas, y aunque actualmente aún no se han logrado generar anticuerpos neutralizantes de amplio espectro mediante ninguna de estas, conforme avanza el tiempo, se han ido adquiriendo conocimientos que van acercando cada vez más al objetivo final. Resulta por demás obvio que la búsqueda de nuevos anticuerpos neutralizantes, sea fundamental para aportar nuevas estructuras como fuentes de estudio y desarrollo. Las evidencias acerca del potencial de los bNAbs son tan claras, que se acepta como un hecho el que una eventual generación de respuestas de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, equivaldría a resolver el problema de la vacuna contra VIH-1.

En Julio del 2002, se anunció la creación de un proyecto multimillonario dedicado exclusivamente a la búsqueda y estudio de bNAbs contra VIH-1, el Consorcio para los Anticuerpos Neutralizantes (NAC; del inglés, Neutralizing

Antibody Consortium), asociación creada por La Iniciativa Internacional para la Vacuna contra el SIDA (IAVI; del inglés, International AIDS Vaccine Initiative), para coordinar una red internacional de investigación dedicada a la búsqueda de nuevos anticuerpos, así como a la determinación de las estructuras tanto de anticuerpos como de regiones en gp120/gp41 para el diseño racional de una vacuna (<http://www.iavi.org>). Esta organización ha coordinado exitosos proyectos entre 17 entidades públicas y privadas dedicadas a la investigación del VIH-1 en 9 países alrededor del mundo, logrando organizar recolección de muestras de pacientes infectados de todos estos países. Entre sus logros destaca el aislamiento de dos nuevos y potentes bNAbs después de analizar la respuesta neutralizante en el suero de aproximadamente 1,800 voluntarios infectados (Simek et al., 2009). Los proyectos coordinados por el NAC destacan por alto nivel de organización e inversión económica, no obstante, no son los únicos dedicados hacia este enfoque (Corti et al., 2010; Li et al., 2009; Sather et al., 2009; Scheid et al., 2009).

### **2.5.5 Avances en las estrategias para la búsqueda de nuevos anticuerpos**

Los más recientes proyectos de búsqueda de nuevos bNAbs, al igual que en un principio, se han basado en la selección de pacientes con sueros polireactivos, sin embargo, en la actualidad, la tendencia es llevar a cabo búsquedas a gran escala. También se han desarrollado otras nuevas estrategias que consisten en clasificar las células mediante la técnica de cell sorting, antes de iniciar el proceso de generación de monoclonales (Scheid et al., 2009). Estos y otros nuevos enfoques pretenden, evidentemente, aumentar las posibilidades de encontrar nuevos anticuerpos.

En la actualidad, los proyectos de búsqueda de anticuerpos están, acompañados de perfeccionados métodos para los ensayos de neutralización. Además, se cuenta con más información de secuencias de aislados primarios de VIH-1 con las que es posible generar paneles de virus divergentes, para verificar la amplitud de la capacidad neutralizante de los sueros, durante la etapa de cribado. Esto último es particularmente importante para aquellos proyectos en donde se tiene que analizar la neutralización en sueros a gran escala, puesto que es para tal propósito es imprescindible contar con un panel de virus lo menos numeroso posible, pero que represente la diversidad del virus, tanto como sea posible. Para la anterior se cuenta con programas informáticos de análisis filogenético.

### **2.5.6 Búsqueda de nuevos anticuerpos neutralizantes en la era de la Terapia Antirretroviral de Gran Actividad**

Desde un inicio, los estudios enfocados hacia la búsqueda de bNAbs, se han llevado a cabo principalmente empleando individuos que no se encuentran en tratamiento antirretroviral o excepcionalmente, en monoterapia. En algunos casos se ha trabajado con pacientes que estuvieron en tratamiento pero que lo habían dejado por un tiempo prolongado. De hecho, como ya se ha hecho mención, los estudios que condujeron a la búsqueda de NAbs comenzaron sólo poco tiempo después de iniciarse los primeros ensayos de antirretrovirales, por lo que puede decirse que la búsqueda de bNAbs comenzó antes del inicio del auge de la era de los antirretrovirales entre 1989 y 1995 (Sterne et al., 2009).

Debido a los éxitos de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), su uso se encuentra ampliamente generalizado, principalmente en los países desarrollados. Actualmente solo queda por establecer un consenso que defina las condiciones y el tiempo ideales para iniciar el tratamiento. Se sabe que existe una reconstrucción en el sistema inmune gracias al tratamiento (Autran et al., 1997; Autran et al., 1999; Li et al., 1998). Existen argumentos que defienden la iniciación del tratamiento en las etapas tempranas después de la seroconversión, cuando los pacientes aún son asintomáticos (Jain and Deeks, 2010). Uno de los argumentos que justifican una rápida iniciación en el tratamiento, se basa en evitar tanto como sea posible, los efectos irreversibles de algunas de las funciones del sistema inmune por parte del virus (Moir and Fauci, 2009). Las actuales pautas para determinar el tiempo de iniciación del tratamiento, por ejemplo, una cuenta de menos de 350 células CD4/ $\mu$ L (<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>) permiten al virus causar graves daños al sistema inmune. Uno de los objetivos buscados mediante una intervención temprana con antirretrovirales, es que los individuos infectados preserven, tanto como sea posible, todas las funciones del sistema inmune para que, eventualmente (en combinación con alguna terapia p. ej. Inmunización con virus autólogos) logre contribuir a combatir la infección. Los resultados de un reciente estudio empleando más de 45,000 pacientes, sugieren que los efectos benéficos del tratamiento, son mayores cuando este se inicia durante los 2 primeros años después de la seroconversión (Sterne et al., 2009). Otra razón fundamental y de las más importantes,

que justifica el inicio temprano del tratamiento, es que ello reduce el riesgo de transmisión (Lima et al., 2010).

En el terreno de la terapia antirretroviral, las evidencias muestran una marcada tendencia hacia una intervención cada vez más temprana, lo cual paradójicamente y en teoría, afectaría al campo de búsqueda de nuevos bNAbs, puesto que, como ya se ha mencionado, los pacientes en tratamiento hasta hoy, no son elegibles para dicha búsqueda. Las limitaciones que dicha tendencia podrían causar en el terreno de la búsqueda de bNAbs no son fáciles de medir, sin embargo se advierte a simple vista que en todo caso serían marginales, y la razón es muy sencilla puesto que, desafortunadamente, aunque en declive, el número de nuevos contagios es aún muy alto, y más desafortunado aún es el hecho de que existen millones de personas que no tienen acceso al tratamiento, a pesar de los esfuerzos internacionales (<http://www.unaids.org>).

Ya se ha subrayado la importancia de buscar nuevos bNAbs y sin embargo, se está dejando de un lado (Doria-Rose et al., 2010; Li et al., 2009; Mikell et al., 2011; Piantadosi et al., 2009; Sajadi et al., 2009; Sather et al., 2009) a un importante y porcentualmente mayoritario grupo de individuos infectados (en países desarrollados), con características inmunológicas especiales (Moir and Fauci, 2009). Es importante analizar las razones con las que se cuentan para excluir a los pacientes bajo tratamiento, de todo proyecto de búsqueda de nuevos anticuerpos neutralizantes.

### **2.5.7 Argumentos para excluir a pacientes bajo tratamiento de los proyectos de búsqueda de nuevos bNAbs**

Existen dos argumentos que hasta ahora han prevalecido como válidos, para excluir a los pacientes en tratamiento, de todo proyecto de búsqueda de nuevos bNAbs, 1) el riesgo a obtener falsos positivos debido a la presencia de un factor neutralizante en las muestras, y 2) la hipótesis que propone que los pacientes en tratamiento no son capaces de generar bNAbs.

Ante la oportunidad que representan los bNAbs, como herramientas para encontrar la solución de la vacuna contra VIH-1, es importante analizar detalladamente los factores a favor y en contra que representa la inclusión o rechazo de pacientes bajo tratamiento, en proyectos de búsqueda de nuevos bNAbs.

#### **2.5.7.1 Riesgo a obtener falsos positivos debido a la presencia de un factor neutralizante en las muestras**

A finales de la década de los 90 cuando la TARGA, ya era de aplicación común y a la vez, la búsqueda de nuevos bNAbs cobraba más fuerza, comenzaron a surgir inquietudes acerca del riesgo lógico de obtener falsos positivos, debido a la presencia de un factor inhibitorio de la replicación viral, en el suero de los pacientes bajo tratamiento. También en esos años, se formulaban hipótesis acerca de los efectos que la TARGA pudiese ejercer en respuesta humoral neutralizante, debido a la restauración de la inmunocompetencia.



En 1999, Evans et al. (Dreyer et al., 1999), llevaron a cabo un estudio de neutralización de VIH-1 en 37 pacientes infectados, seleccionados por su bajo o nulo nivel de progresión de la enfermedad y de los cuales 24 estaban bajo tratamiento. Los resultados de este estudio, muestran una clara contribución a la neutralización por parte de los antirretrovirales, lo cual, justificaría el rechazo de este grupo de pacientes para este tipo de estudios. Sin embargo, resulta evidente que estos resultados están sesgados por la sensibilidad del tipo de ensayo de neutralización, el cual no permite el uso de altas diluciones de suero para alcanzar concentraciones inhibitorias del 50% ( $IC_{50}$ ) verdaderamente representativas. En este estudio, la dilución usada como base para los ensayos de neutralización fue de 1:40, la cual es muy baja. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de los antirretrovirales a diluciones de 1:100, tal efecto desapareció. Estudios más recientes han demostrado que  $IC_{50}$ 's a diluciones a partir de 1:125 hasta 1:300 son capaces de conferir protección in vivo (Hessell et al., 2009), y otros estudios de neutralización manejan diluciones por encima de 1:1000 (Binley et al., 2000; Kimura et al., 2002).

Con lo anterior queda claro que el uso de sistemas más sensibles para ensayos de neutralización que permitan trabajar con diluciones por encima de 1:100, sería suficiente para evitar el problema de los falsos positivos, al menos para la mayoría de los antirretrovirales actualmente en uso. Además, actualmente existen sencillos métodos de diálisis que teóricamente permiten eliminar del suero a los antirretrovirales, incluyendo aquellos altamente residuales. También es de uso común el uso de virus que permiten evaluar los efectos de los antirretrovirales, tales como el virus

de VIH-1 pseudotipado con las proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV-ENV-VIH-1) (Bailey et al., 2006a).

#### **2.5.7.2 ¿Los pacientes en tratamiento no son capaces de generar bNAbs?**

La generación de respuestas de NAbs en pacientes infectados por VIH-1, es en sí, un tema que aún mantiene múltiples incógnitas, a las cuales se suman las de los efectos causados por el tratamiento antirretroviral. El efecto del tratamiento antirretroviral sobre la generación de respuesta de NAbs, ha sido un tema debatido desde hace ya más de una década. Factores opuestos están involucrados; la reducción de la replicación del VIH-1 limita el daño causado por el virus al sistema inmune (Rosenberg et al., 1997), sin embargo, la disminución de la concentración de los antígenos virales, podría restringir la maduración o mantenimiento de las respuestas virales (Lafeuillade et al., 1997; Markowitz et al., 1999; Morris et al., 1998; Ortiz et al., 1999).

Se sabe que tanto los títulos de anticuerpos de unión específica a los antígenos de VIH-1, como las respuestas de células B no específicas, son sensibles a la TARGA (Morris et al., 1998; Lafeuillade et al., 1997; Markowitz et al., 1999). Sin embargo, han habido muchas incógnitas respecto al efecto de la terapia, sobre la respuesta de NAbs. En un estudio de monoterapia con zidovudina, se observó una modesta disminución en los títulos de NAbs (Wainberg et al., 1996), pero otro describió un incremento (Schmidtmayerova et al., 1992). En un tercer estudio, algunos pacientes que recibieron terapia combinada, tuvieron un incremento en los títulos neutralizantes,

pero en otros, los niveles decrecieron (Sarmati et al., 1997). Posteriormente, otro estudio incluso encontró un efecto nulo por parte de la TARGA en los títulos de NAbs (Dreyer et al., 1999).

Estudios cada vez más detallados comenzaron a reflejar con cierta claridad, algunas pautas de las cuales podría depender la generación de la respuesta neutralizante. Múltiples evidencias demostraron que la TARGA ejerce un efecto inhibitorio en la generación de NAbs (Binley et al., 2000; Morris et al., 1998), pero que tal tendencia dependerá de múltiples factores, siendo uno de los más importantes la etapa en la cual se inicia la terapia. Binley et al., (Binley et al., 2000) observaron que pacientes tratados muy pronto después de la infección, no llegaron a desarrollar respuestas neutralizantes, en contraste, cuando la TARGA fue iniciada varios años después de la infección, a menudo esta tuvo poco efecto sobre los títulos de anticuerpo contra las proteínas estructurales del VIH-1. Se ha especulado que para entonces, podrían haber suficientes depósitos de antígeno en los tejidos linfáticos para mantener la producción de anticuerpos, de manera que una disminución de la cantidad de antígeno circulante tendría poco impacto (Binley et al., 2000).

Los efectos de una supresión viral temprana en la generación de NAbs, también se han podido observar entre el grupo de pacientes conocido como controladores de élite, un subgrupo de los No progresores de largo plazo (LTNP; del inglés, long-term nonprogressors) quienes mantienen cargas virales por debajo de 50 copias por mililitro, sin terapia antirretroviral. Bailey et al. (Binley et al., 2000; Kimura

et al., 2002), encontraron niveles insignificantes de neutralización en un pequeño grupo de controladores de élite, a la vez que observaron que este grupo de pacientes albergaban virus con un nivel muy bajo de diversidad a nivel de la región env. Se sabe que la diversificación viral, particularmente a nivel de la región env (longitud de las regiones V1-V5 y número de glicanos unidos a asparagina en la región V1-V5), se da como consecuencia de la presión por parte de los anticuerpos (Chohan et al., 2005; Frost et al., 2005). Por lo tanto, al no observarse diversificación viral, se concluyó que el virus fue suprimido muy pronto después de la infección, posiblemente mediante las células CD8<sup>+</sup> sin dar lugar a la maduración de la respuesta neutralizante.

Resultados más cautelosos acerca de la generación de respuestas neutralizantes en pacientes tratados también fueron surgiendo. Un hallazgo importante publicado por varios grupos (Binley et al., 2000; Joos et al., 2005; Kimura et al., 2002), resultó de ensayos en donde pacientes con una adherencia intermitente a la terapia, desarrollaron NAbs contra los virus autólogos, a menudo a altos títulos. Esto coincidió con breves períodos de viremia. A partir de estas evidencias se propuso que la inducción de respuestas fuertes de NAbs durante una infección primaria por VIH-1 debería requerir, en principio, un estrecho contacto con el virus, seguido de la supresión de la replicación de los virus mediante TARGA, para permitir la recuperación de la competencia inmunológica, y finalmente, nuevas exposiciones a glicoproteínas de superficie nativa.

A pesar de que los efectos de la TARGA sobre la generación de anticuerpos neutralizantes, seguían siendo algo debatible, las evidencias se inclinaban hacia un efecto promotor de la generación, al menos bajo ciertas condiciones como se acaba de mencionar. Sin embargo, más lejos estaban aún las respuestas concretas acerca del papel protector de tales anticuerpos, puesto que los estudios habían sido llevados a cabo evaluando la respuesta neutralizante solamente contra virus autólogos contemporáneos. También hacía falta verificar la amplitud de respuesta de los anticuerpos generados en pacientes tratados.

Bailey et al. (Bailey et al., 2006a), estudiaron el papel de los NAbs en nueve pacientes en TARGA, siete pacientes crónicos sin tratamiento y nueve controladores de élite. Para ello, llevaron a cabo ensayos de neutralización empleando el plasma de cada paciente contra pseudovirus autólogos generados a partir de secuencias completas de env aisladas de virus de plasma (llamados virus contemporáneos), y de provirus derivados de células CD4<sup>+</sup> (llamados virus antiguos) para cada uno de los pacientes. Los ensayos de neutralización también fueron llevados a cabo empleando dos cepas sensibles a neutralización como parámetro de la reactividad cruzada. En este estudio se observó, que los títulos de NAbs contra cepas sensibles a neutralización fueron mucho más bajos en pacientes en tratamiento y controladores de élite, comparado con la respuesta en infectados crónicos. Respecto a la neutralización autóloga, y a pesar de que en pacientes con tratamiento, los resultados fueron muy diversos, se concluyó que los NAbs no juegan un papel dominante en el control de la viremia ni en la selección de variantes virales en plasma. No obstante que el estudio fue bastante

completo, se aprecia a simple vista que el número de muestras es muy pequeño, además, las conclusiones fueron tomadas a pesar de que solo tres de los nueve pacientes con tratamiento mostraron poca o nula neutralización contra los virus de plasma o provirales. El resto de los pacientes mostraron una clara neutralización contra unas variantes y poca o muy poca respuesta contra otras. Tampoco de muestra algún análisis acerca del tiempo de iniciación del tratamiento o si se experimentaron o no, interrupciones en la adherencia al tratamiento por ejemplo.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro proveen importante información en la carrera hacia el diseño de una vacuna contra el VIH-1. Hasta hoy, gracias a los bNAbs se han descubierto algunas regiones de neutralización ampliamente conservadas, sin embargo, debido al tamaño y estructura del complejo gp41/gp120, el número de tales regiones puede ser grande. Los proyectos de búsqueda de bNAbs, basándose en argumentos debatibles, excluyen a pacientes en tratamiento antirretroviral, el cual representa un grupo numeroso y con características inmunológicas diversas pero sobre todo, con un sistema inmune reconstituido a diferentes niveles gracias a la terapia. Es necesario verificar a profundidad, la capacidad de generación de bNAbs en pacientes bajo tratamiento, puesto que se podría estar dejando de lado a una fuente importante de información en el terreno de la búsqueda de nuevos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

1. Evaluar la respuesta de generación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, en pacientes bajo tratamiento antirretroviral con carga viral indetectable, mediante un estudio a gran escala.

### **4.2 Objetivos específicos**

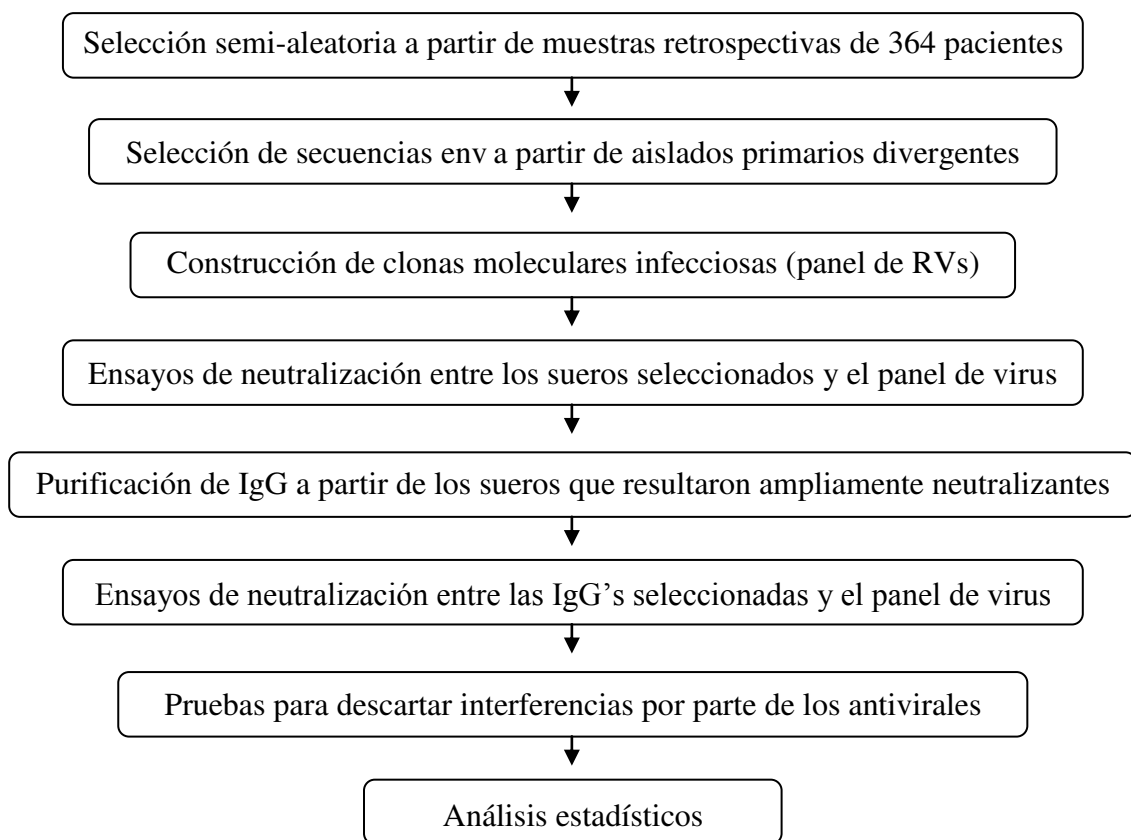
1. Generar un panel de virus recombinantes (RVs; del inglés, recombinant viruses) de aislados primarios de VIH-1, que represente la diversidad global del VIH-1.
2. Diseñar un ensayo de neutralización a gran escala basado en RVs de VIH-1.
3. Realizar un estudio de neutralización de VIH-1 a gran escala, empleando pacientes VIH-1<sup>+</sup>, con y sin tratamiento antirretroviral.



## **5. HIPÓTESIS**

Los pacientes bajo tratamiento antirretroviral son capaces de generar anticuerpos neutralizantes de amplio espectro a pesar de mantener cargas virales indetectables.

## 6. ESTRATEGIA GENERAL



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Muestras de pacientes VIH-1+

Las muestras de suero y plasma utilizadas en este estudio, provienen de un banco de muestras del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona (España). Este banco de muestras ha sido generado a través de un programa de seguimiento al que están sujetos voluntariamente, pacientes VIH-1+ del citado hospital. Todos los pacientes han firmado una hoja de consentimiento informado. Se ha hecho una selección semi-aleatoria a partir de muestras retrospectivas de 364 pacientes. En el 30% de los casos fueron tomadas más de una muestra, generando un total de 508 muestras analizadas. Los participantes son individuos adultos VIH+ clínicamente asintomáticos, con y sin tratamiento antirretroviral, radicados en Cataluña, España.

El 82.1% de los participantes son hombres y el 17.9% mujeres. El 24.7% de las transmisiones fueron por contacto heterosexual, mientras que la transmisión por contacto entre hombres que practican sexo con hombres (HSH) fue del 58.5%. El 7.4% resultó del uso de drogas intravenosas, y un 4.5% incluyó transmisiones por transfusión de sangre y a individuos que declararon ignorar la ruta de transmisión. No hubo datos acerca de la ruta de transmisión para el 4.9% de las muestras. Se presume que todos los pacientes están infectados con VIH-1 del subtipo B, en base al lugar de residencia. La

Tabla IV muestra las características demográficas de los pacientes: la media y rango de las cuentas de células T CD4<sup>+</sup> para cada paciente, la carga viral, número de años desde el diagnóstico positivo para VIH-1 al tiempo del estudio, características del tratamiento, y número de años bajo terapia.

173 (47,5%) de los pacientes estaban en tratamiento antirretroviral y mantenían cargas indetectables de viremia (<50 copias/mL de plasma) y una media de 689 células T CD4<sup>+</sup>/μL. 191 (52,5%) pacientes no estaban tratados al momento de la toma de muestras y mantenían una media de 10,241 copias de RNA viral por mL de plasma y una media de 567 células T CD4<sup>+</sup>/μL de plasma. El promedio del número de años desde el diagnóstico fue de 9 para los pacientes tratados y 5 para pacientes sin tratamiento. El promedio del número de años en terapia antirretroviral fue de 5 (Tabla IV).

Los sueros fueron obtenidos mediante técnicas convencionales empleando tubos de separación, y el plasma fue colectado usando tubos con ácido-citrato-dextrosa o EDTA. Todas las muestras fueron separadas en alícuotas de 1 mL, inactivadas por 30 minutos a 56° C y almacenadas a -80° C. Aunque el plasma fue colectado y almacenado, solo se empleó en un caso para purificación de IgG.

## **7.2 Construcción de clones moleculares infecciosos de diferentes aislados primarios del VIH-1**

La construcción de clones moleculares infecciosos del VIH-1, se llevó a cabo a partir de la sustitución de la secuencia env de un clon de pNL4-3, por secuencias env de aislados primarios.

### **7.2.1 Obtención del fragmento pNL4-3 $\Delta$ env**

1. La forma plasmídica de la clona molecular NL4-3 fue purificada como se señala en la sección 7.2.4 de purificación de DNA plasmídico y se digirió con NotI (Promega, Madison, WI) siguiendo el protocolo de fabricante.

El sitio NotI es un sitio de corte único en la secuencia del pNL4-3 que ha sido añadido a la secuencia original (accession: AF324493). Está diseñado para escindir en el nucleótido 8,798. Esta modificación ha sido llevada a cabo por el grupo del Dr. José Alcamí del Instituto Carlos III de Madrid.

2. El producto (lineal) de la digestión fue purificado en columna de afinidad empleando el sistema comercial QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Venlo, Holanda). Una vez cuantificado por espectrofotometría, se digirió nuevamente con EcoRI (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. El sitio EcoRI a su vez, corta en el nucleótido 5,744.

El corte en estos dos sitios (NotI y EcoRI), generan dos fragmentos lineales. Uno de los fragmentos es de 3,054 pb que contiene parte de vpr, las secuencias completas de tat, vpu, rev, y env, y un fragmento de nef. Para los fines prácticos de

este estudio, este fragmento recibe el nombre de env, en este caso en particular, es la región env de la cepa NL4-3. El segundo de los fragmentos es de 11,770 pb y alberga el resto de las secuencias de NL4-3. Para los fines prácticos de este estudio, este fragmento recibe el nombre de pNL4-3 $\Delta$ env.

3. Los dos fragmentos generados por la doble digestión, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA fue teñido con el reactivo SYBR<sup>®</sup>(Invitrogen, Carlsbad, CA) y visualizado a través de un transiluminador de luz azul Dark Reader DR-45M (Clare Chemical Research, Dolores, CO). Para conocer el tamaño de las bandas se corrió en paralelo el marcador de peso molecular 1kb ladder (Promega, Madison, WI).
4. La banda de 11,770 pb (pNL4-3 $\Delta$ env) fue identificada y se extrajo mediante corte con bisturí la sección de agarosa conteniendo dicha banda. El fragmento de DNA fue extraído de la matriz de agarosa y purificado mediante el método comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez purificado, el producto se cuantificó y se almacenó a -20° C.

### **7.2.2 Obtención del fragmento env de aislados primarios**

Las cepas de virus elegidas (para establecer un panel representativo de la diversidad del virus), fueron seleccionadas mediante el análisis de secuencia de un grupo de aislados primarios de referencia. La selección se hizo en base al grado de diversidad en la región V3C3 (abarcando desde el aminoácido 300 al 392 de la

glicoproteína gp120, de acuerdo a la numeración basada en HxB2) tal como se describe a continuación:

1. Las secuencias nucleotídicas de las cepas de referencia fueron descargadas desde la base de datos de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). Todas aquellas secuencias de nuestros aislados, las cuales resultaron con huecos en al menos una posición, fueron excluidas de los análisis posteriores; el número de bases diferentes en los análisis de comparación de apareamiento y análisis filogenético, fue determinado mediante el programa MEGA; las matrices de distancia de DNA fueron calculadas mediante el método Kimura de dos parámetros y se construyó un árbol filogenético con matrices de distancia usando el método Neighbor-Joining; finalmente, la robustez del árbol fue evaluada mediante un análisis de arranque (bootstrap) de 1,000 réplicas.
2. Las cepas seleccionadas fueron provistas por H. Holmes (NIBSC, Reino Unido) a través del consorcio NeutNet (G. Scarlatti) (Euler et al., 2010). Las cepas son las siguientes (el subtipo se muestra entre paréntesis): VI 191 (A), 92BR025 (C), 92UG024 (D), CM244 (E), and AC10 (B).
3. Las clonas moleculares de los aislados primarios seleccionadas, fueron purificados como se señala en la sección de purificación de DNA plasmídico. Cada clona fue procesada siguiendo las indicaciones del punto 1 al 3 del apartado anterior.

4. La banda de 3,054 pb (env) fue identificada y se extrajo con bisturí la sección de agarosa conteniendo dicha banda. El fragmento de DNA fue extraído de la matriz de agarosa y purificado mediante el método comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez purificado, el producto se cuantificó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **7.2.3 Ligación y verificación de secuencia**

1. Una vez purificados los fragmentos pNL4-3 $\Delta$ env, así como las regiones env de cada uno de los aislados primarios, se procedió a unir al fragmento pNL4-3 $\Delta$ env con cada uno de las regiones env mediante reacciones de ligación. Para ello se utilizó el sistema Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de cada una de las reacciones de ligación, se espera tener formas plasmídicas de clonas moleculares infecciosas de virus recombinante.
2. Para amplificar dichas clonas moleculares, cada una de las reacciones de ligación fue transformada en células de E. coli MAX Efficiency® Stbl2™ Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al término de cada reacción de transformación, las células fueron extendidas en placas de agar LB (Sigma), conteniendo 50  $\mu\text{g/mL}$  de Ampicilina.
3. Después de 24 horas se seleccionó un número aleatorio de colonias, se cultivaron en medio LB líquido (50  $\mu\text{g/mL}$  de Ampicilina) y 24 horas después se procedió a



purificar el DNA plasmídico de la manera como esta señalado en la sección de purificación de DNA plasmídico.

4. Los plásmidos fueron verificados en una primera etapa mediante el tamaño por electroforesis en gel de agarosa, empleando como patrón de corrida una muestra de pNL4-3. Una vez verificado el tamaño, los candidatos seleccionados fueron verificados mediante análisis de secuencia mediante el sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la tabla III:

**Tabla III.** Listado de oligonucleótidos. Entre paréntesis el sentido correspondiente a la cadena.

VI 191	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(+)	GATCAAGCTTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
92UG024	(+)	ATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTG
	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(+)	GATCAAGCTTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
	(+)	GTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCAC
	(-)	GACTGCCATTTAACAGCAGTTGAG
	(+)	TCTGGATCCAACCTGCTGTAAATGGCAGTC
	(-)	TGGCCTGATTCCATGTGTACATTG
AC10	(-)	TTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA
	(+)	TCTGGATCCAACCTGCTGTAAATGGCAGTC
	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(-)	GTGAATATCCCTGCCTAACTCTATTCAC
	(+)	GTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCAC
	(-)	GACTGCCATTTAACAGCAGTTGAG
	(-)	GTGAATATCCCTGCCTAACTCTATTCAC
92BR025	(-)	TCTAAGCTTCACTTCTCCAATTGTCCCTC
	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(-)	GACTGCCATTTAACAGCAGTTGAG
	(-)	GTGAATATCCCTGCCTAACTCTATTCAC
	(-)	TCTAAGCTTCACTTCTCCAATTGTCCCTC
	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(-)	GACTGCCATTTAACAGCAGTTGAG
CM 244	(-)	GTGAATATCCCTGCCTAACTCTATTCAC
	(-)	TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT
	(-)	GACTGCCATTTAACAGCAGTTGAG
	(+)	TTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA

### 7.2.4 Purificación de DNA plasmídico

1. Cada clona molecular fue transformada en células de E. coli MAX Efficiency® Stbl2™ Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Las células transformadas fueron extendidas en placas de Petri con agar LB (Sigma) con 50 µg/mL de Ampicilina, para obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron toda la noche a 30° C.

3. Al día siguiente, mediante una varilla estéril, se seleccionó una colonia, que serviría para inocular un tubo de ensayo con medio líquido LB con 50 µg/mL de Ampicilina. El tubo fue incubado toda la noche a 30° C con agitación a 200 RPM.
4. Al día siguiente el tubo con el cultivo crecido, fue utilizado para inocular 500 mL de medio líquido LB con 50 µg/mL de Ampicilina, y se incubó toda la noche a 30° C con agitación a 200 RPM.
5. El cultivo de toda la noche fue centrifugado a 5,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y la pastilla fue secada al aire para remover el exceso de medio.
6. El plásmido fue purificado empleando el sistema comercial Pure Yield™ Plasmid Maxiprep System (Promega, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del manual técnico del fabricante.
7. La concentración y pureza del DNA obtenido se ha determinado por espectrofotometría y se ha hecho una evaluación visual de la integridad y tamaño del plásmido mediante electroforesis en agarosa y tinción con reactivo SYBR® (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DNA ha sido visualizado en un transiluminador de luz azul Dark Reader DR-45M (Clare Chemical Research, Dolores, CO).

### **7.3 Cultivo de células 293-T/17 y TZM-bl**

La línea 293-T/17 son células adherentes que provienen de riñón embrionario humano ([ATCC:CRL-11268] LGC Promochem: Cell Biology Collection).

La línea TZM-b1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program [Cat. No. 8129]), es una línea celular HeLa CXCR4+ que expresa el receptor, CD4, la molécula correceptora, CCR5, y un gen de la Luciferasa controlado a través de la secuencia LTR como gen reportero. La manipulación de estas células y de los reactivos que intervengan en este proceso debe llevarse a cabo en cabinas de flujo laminar clase II (A/B3 recomendado).

### **7.3.1 Procedimiento de descongelación**

1. Añadir 50 mL de medio (Dulbecco modified Eagle medium [DMEM], 10% suero fetal bovino [SFB]) (Invitrogen, Carlsbad, CA) a un frasco de cultivo celular de poliestireno con una superficie de crecimiento de 25 cm<sup>2</sup> y tapa con ventilación, y colocarlo en el baño de agua a 37° C para atemperar.
2. Sacar un vial de células 293-T/17 o TZM-b1 de la atmósfera de congelación en la que se encuentre. Es recomendado llevarlas a una descongelación suave sumergiendo el vial ya sea en hielo en agua ó nieve carbónica en etanol. Cada vial de células congeladas debe haber  $\geq 5 \times 10^6$  células/mL.
3. Una vez descongelado el volumen del vial, añadir este al frasco con DMEM-SFB 10% y dejar incubar 2 horas en una estufa a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire, en posición vertical para favorecer la sedimentación y agrupación de las células.
4. Recoger cuidadosamente tanto sobrenadante como sea posible, evitando resuspender las células sedimentadas, para ello debe usarse una pipeta estéril.

5. Añadir DMEM-SFB 10% hasta un volumen de ~10 mL y transferir a un frasco de cultivo celular de poliestireno con una superficie de crecimiento 75 cm<sup>2</sup> y tapa con ventilación.
6. Incubar en una estufa a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Los frascos se colocan en posición horizontal.
7. A partir de este punto de lleva a cabo el proceso de mantenimiento y pases.

### **7.3.2 Procedimiento de mantenimiento y pases**

1. Verificar el crecimiento de la monocapa de células al microscopio, una vez alcanzada una confluencia cercana al 100% y comprobado el buen estado de las células se procede a llevar a cabo el pase de células.
2. Retirar con pipeta el medio de cultivo y agregar 4 mL de Tripsina-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente, agitar suavemente el frasco en posición horizontal para enjuagar los restos del medio de cultivo.
3. Retirar con pipeta la Tripsina-EDTA de lavado y añadir 4 mL más de Tripsina-EDTA.
4. Agitar suavemente el frasco en posición horizontal para distribuir la Tripsina por toda el área de crecimiento, la acción de la enzima provoca que las células se despeguen. El proceso no debe durar más de 3 minutos (se recomienda colocar el frasco en la estufa a 37° C para optimizar el proceso). Para el caso de TzM-b1, será necesario golpear suavemente el frasco para facilitar la separación de las células.

5. Una vez que las células se han despegado, detener la acción de la Tripsina añadiendo 6 mL de medio DMEM-SFB 10% y mezclar suavemente por pipeteo unos segundos.
6. Retirar/descartar 9 mL de la suspensión y añadir 9 mL de DMEM-SFB 10% (a temperatura ambiente) al mililitro de suspensión restante, de esta manera se obtiene un pase a una dilución 1:10 (a esta dilución los cultivos de 293T/17 y TZM-b1 llegan a confluencia en ~72 horas con lo cual el mantenimiento de lleva a cabo dos veces por semana. Se recomienda no exceder de 20 pases).
7. Dispersar las células unos minutos en el frasco de cultivo en posición horizontal y de la misma manera colocarlo en un incubador a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

### **7.3.3 Procedimiento de conservación (congelación)**

Cuando el cultivo esté formando una monocapa a un ~75% de su confluencia se procede a despegar las células para su congelación. Se realiza el mismo procedimiento descrito para el pase de células, apartado anterior del paso 1 al 5.

1. Se cuantifica el número de células y su viabilidad mediante el método de azul tripán en cámara de Neubauer. Los viales (criotubos) estarán compuestos de  $5 \times 10^6$  células/mL de medio de congelación (DMEM-SFB 10%, DMSO 10%).
2. Mantener los criotubos en frío en un contenedor térmico. Congelar a -80° C y posteriormente llevar al contenedor de Nitrógeno líquido.

## **7.4 Obtención de partículas virales en células 293T/17**

Obtención de partículas virales recombinantes funcionales de un solo ciclo, a partir de DNA plasmídico, mediante la introducción del DNA en células 293-T/17 por el método calcio-fosfato. La transfección se ha llevado a cabo empleando el sistema comercial ProFection® Mammalian Transfection System (Promega, Madison, WI) siguiendo el protocolo del fabricante.

### **7.4.1 Reactivos (provistos por el sistema comercial):**

1.  $\text{CaCl}_2$  2M.
2. 2X HEPES-Buffered Saline (HBS 2X).
3. Agua libre de nucleasas.

### **7.4.2 Muestras**

Construcciones plasmídicas (ver sección 7.2 Construcción de clonas moleculares infecciosas de diferentes aislados primarios del VIH-1) y el clon molecular infeccioso NL4-3 obtenido gracias al Dr. José Alcamí del Instituto Carlos III de Madrid.

### **7.4.3 Procedimiento**

#### **DÍA -1**

1. Llevar a cabo del punto 1 al 5 del procedimiento de mantenimiento y pases del cultivo de células (sección 7.3.2).
2. Cuantificar el número de células mediante el método de azul tripán en cámara de Neubauer y añadir en un frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, 10 mL de la suspensión celular con  $1,5 \times 10^5$  células/mL.

#### **DÍA 0**

1. Reemplazar el medio de las células con 10 mL de DMEM-SFB 10% 3 horas antes de la transfección, continuar incubando a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire.
2. En una campana de flujo laminar clase II (A/B3 recomendado), mezclar 5 µg de DNA con 62 µL de CaCl<sub>2</sub> y llevar a un volumen de 500 µL con agua libre de



nucleasas. Por cada tubo de mezcla de DNA preparar un tubo con 500  $\mu$ L de HBS 2X (todas las soluciones deben estar a temperatura ambiente y previamente agitadas).

3. Colocar el tubo con HBS 2X en un agitador para mezclar suavemente y añadir lentamente por goteo la mezcla de DNA-  $\text{CaCl}_2$ .
4. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos.
5. Agitar suavemente la mezcla y añadirla por goteo a las células. Se recomienda que la mezcla DNA/ $\text{CaCl}_2$ /HBS caiga inicialmente sobre el medio y no directamente sobre las células, para ello se coloca el frasco verticalmente.
6. Agitar suavemente el frasco en posición horizontal para distribuir la mezcla por toda el área de crecimiento.
7. Incubar a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire.

#### **DIA +1**

1. Reemplazar el medio de las células con 10 mL de DMEM-SFB 10% e Incubar a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire.

#### **DIA +2**

1. Recoger el sobrenadante (en el cual se encuentra el virus) y pasarlo a un tubo para centrifuga estéril.
2. Centrifugar a 1,500 rpm 5 minutos para eliminar restos celulares.

3. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y centrifugar nuevamente a 1,500 rpm 5 minutos.
4. Pasar el sobrenadante a un tubos nuevos de 10 mL y congelar a  $-80^{\circ}$  C (se recomienda hacer una alícuota de  $\sim 1$  mL para llevar a cabo los análisis de infectividad y el ensayo de p24).

### **7.5 Elisa de captura para el antígeno p24**

La presencia del antígeno p24 en los sobrenadantes de las células 293T/17, transformadas con clonas moleculares de RVs-VIH-1, fue cuantificada mediante un ELISA de captura de antígeno (Innogenics, Bélgica). El ELISA fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Una curva estándar, fue trazada con la lectura de absorbancia recopilada a partir del p24 estándar provisto por el sistema y las concentraciones de las muestras fueron determinadas a partir de la curva. Un control negativo compuesto por sobrenadante de células sin transfectar fue incluido. Las reacciones fueron leídas en un lector Tecan Sunrice (Tecan, Suiza).

### **7.6 Ensayo de infectividad**

La infectividad de los RVs fue calculada mediante el ensayo de infección celular en TZM-b1 (ver sección cultivo de células 293-T/17 y TZM-b1) (Derdeyn et al., 2000; Platt et al., 1998; Takeuchi et al., 2008). Los ensayos de infectividad con su correspondiente control, fueron llevados a cabo por triplicado (series de B a C), en

placas de cultivo de 96 pozos (nunc) empleando el siguiente diseño y siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DMEM + TZM-b1	TZM-b1 + Virus dil 1:1	TZM-b1 + Virus dil 1:2	TZM-b1 + Virus dil 1:4	TZM-b1 + Virus dil 1:8	TZM-b1 + Virus dil 1:16	TZM-b1 + Virus dil 1:32	TZM-b1 + Virus dil 1:64	TZM-b1 + Virus dil 1:128	TZM-b1 + Virus dil 1:256	
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. A todos los pozos de las orillas de la placa (representados en gris), se les añadieron 150  $\mu$ L de PBS estéril, para mantener la humedad en la placa durante los períodos de incubación.
2. Los pozos del 2B al 2D son utilizados como control negativo (para obtener la actividad basal de la luciferasa en TZM-b1 sin infectar, la cual será eliminada durante los cálculos). A cada pozo se añaden 100  $\mu$ L de DMEM-SFB 10% más  $10^4$  células TZM-b1 en un volumen de 100  $\mu$ L (obtenidas como esta descrito en los pasos del 1 al 5 de la sección de procedimiento de mantenimiento y pases, y cuantificación por el método de azul tripán y cámara de Neubauer).
3. Al resto de pozos desde la serie 3B-3D, hasta 11B-11D, se añaden  $10^4$  células TZM-b1 en un volumen de 100  $\mu$ L, y a continuación, se añaden una serie de diluciones de virus en escala de 1:2 tomando como punto de partida 40ng de p24, hasta 0,156ng (como se indica en el esquema).
4. La placa se transfiere a una incubadora a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Después de 72 horas de incubación, los sobrenadantes son

removidos y la actividad celular asociada a luciferasa para cada pozo, es determinada en un luminómetro de microplacas (Turner biosystems, Sunnyvale, CA) mediante un luciferase assay kit (Biotherma, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Se calcula el promedio de la actividad basal de luciferasa de las TZM-b1 y se elimina del resto de las lecturas. Los promedios de cada lectura son calculados. Una vez obtenidos los promedios, se divide el promedio de cada una de las diluciones de virus, entre el promedio del control sin infectar (a mayor cantidad de virus [menor dilución], mayor tasa de infección y por lo tanto mayor producción de luciferasa, es decir, lecturas más altas). Esta información es finalmente utilizada para calcular una dilución de virus que genere una lectura de 10 veces por encima del control negativo.

### **7.7 Ensayos de neutralización**

Las muestras (suero/IgG purificada/flow-through) seleccionadas fueron probadas con los RVs usando el ensayo de infección celular en TZM-b1 (gen de la luciferasa como reportero). Para la etapa de cribado (screening) se utilizaron los seis RVs del panel. Para las etapas donde se utilizaron tanto la IgG purificada como la fracción flow-through, se utilizó también el VIH-1 pseudotipado con las glicoproteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (VSV-ENV-VIH-1). Los ensayos de neutralización con sus correspondientes controles, fueron llevados a cabo por

triplicado (series B-C y E-F), en placas de cultivo de 96 pozos empleando el siguiente diseño y siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DMEM +	DMEM +	Muestra 1 dil/conc 1 +	Muestra 1 dil/conc 2 +	Muestra 2 dil/conc 1 +	Muestra 2 dil/conc 2 +	Muestra 3 dil/conc 1 +	Muestra 3 dil/conc 2 +	Muestra 4 dil/conc 1 +	Muestra 4 dil/conc 2 +	
C		TZM-b1 +	TZM-b1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	
D			Virus +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	
E		Muestra 5 dil/conc 1 +	Muestra 5 dil/conc 2 +	Muestra 6 dil/conc 1 +	Muestra 6 dil/conc 2 +	Muestra 7 dil/conc 1 +	Muestra 7 dil/conc 2 +	Muestra 8 dil/conc 1 +	Muestra 8 dil/conc 2 +	Muestra 9 dil/conc 1 +	Muestra 9 dil/conc 2 +	
F		Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	Virus 1 +	
G		TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	TZM-b1 +	
H												

1. A todos los pozos de las orillas de la placa (representados en gris), se les añadieron 150  $\mu$ L de PBS estéril, para mantener la humedad en la placa durante los períodos de incubación.
2. Los pozos del 2B al 2D son utilizados como control negativo (para obtener la actividad basal de la luciferasa en las TZM-b1 sin infectar), en cada pozo se añaden 100  $\mu$ L de DMEM-SFB 10%.
3. Los pozos del 3B al 3D son utilizados como control positivo de la infección (no se añade ningún elemento inhibidor, por lo tanto se obtiene un 100% de infección), en este caso se añaden 25  $\mu$ L de DMEM-SFB 10%.
4. A partir de la serie 4B-4D se llevan a cabo ensayos de neutralización. Mediante este diseño de placa es posible analizar lo siguiente:

- a. dos diluciones de nueve sueros (1:200 y 1:2000, diluciones finales del suero cuando entra en contacto con el virus), el suero ha sido previamente inactivado por calor durante 30 minutos a 56° C,
- b. dos distintas concentraciones de IgG purificadas a partir de 9 sueros (0.2 y 0.05 mg/mL de IgG, esta es la concentración final que queda cuando la IgG entra en contacto con el virus) o,
- c. dos diluciones de la fracción flow-through (1:200 y 1:2000, diluciones finales de las fracciones flow-through cuando entra en contacto con el virus).

Para cada caso, se añaden por triplicado, 25  $\mu$ L de suero pre-diluido (1/50 y 1/500), o 25  $\mu$ L de IgG pre-diluida (0.8 y 0.2 mg/mL), o 25  $\mu$ L de flow-through (1/50 y 1/500) desde 4B-4D hasta 11E-11G como se muestra en el esquema.

5. En todos los pozos excepto la serie 2B-2D, se añaden 75  $\mu$ L de virus (la concentración del virus añadido, se ha calculado para obtener lecturas en un orden de 10 veces por encima del control negativo en el ensayo de infectividad). La placa se coloca en un incubador a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire por 1 hora.
6. En todos los pozos se añaden 10<sup>4</sup> células TZM-bl en un volumen de 100  $\mu$ L (obtenidas como esta descrito en los pasos del 1 al 5 de la sección de procedimiento de mantenimiento y pases, y cuantificación por el método de azul tripán y cámara de Neubauer). La placa se coloca en un incubador a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire por 72 horas.

7. Después de 72 horas de incubación, los sobrenadantes son removidos y la actividad celular asociada a luciferasa para cada pozo, es determinada en un luminómetro de microplacas (Turner biosystems, Sunnyvale, CA) mediante un luciferase assay kit (Biotherma, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Se calcula el promedio del control negativo y este valor se elimina del resto de los valores; a continuación se obtiene el promedio del control positivo (3B-3D) y a partir de este valor, que representa el 100% se calcula el porcentaje que representan el resto de los valores; finalmente se calculan los promedios y desviaciones estándar por cada serie (el valor que resulta es el porcentaje $\pm$ desviación estándar de actividad residual de la luciferasa, que es inversamente proporcional al porcentaje de neutralización).

### **7.8 Ensayos de sensibilidad a la neutralización**

La sensibilidad a la neutralización de todos los RVs del panel fue previamente evaluada mediante ensayos de neutralización, empleando los siguientes anticuerpos monoclonales de amplio espectro: b12, 2G12, 2F5, y 4E10. Ocho series de diluciones en escala 1:4, fueron probadas contra los RVs usando el ensayo de infección celular en TZM-b1. Para 4E10, 2F5, y 2G12 la concentración de partida fue de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mientras que para b12 fue de 6,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los ensayos de neutralización con sus correspondientes controles, fueron llevados a cabo por triplicado (series B-C), en placas de cultivo de 96 pozos empleando el siguiente diseño y siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				Anticuerpo dil. 1	Anticuerpo dil. 2	Anticuerpo dil. 3	Anticuerpo dil. 4	Anticuerpo dil. 5	Anticuerpo dil. 6	Anticuerpo dil. 7	Anticuerpo dil. 8	
C		DMEM + TZM-b1	DMEM + TZM-b1 + Virus	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	+ TZM-b1	
D				+ Virus	+ Virus	+ Virus	+ Virus	+ Virus	+ Virus	+ Virus	+ Virus	
E												
F												
G												
H												

6. A todos los pozos de las orillas de la placa (representados en gris), se les añadieron 150  $\mu$ L de PBS estéril, para mantener la humedad en la placa durante los períodos de incubación.
7. Los pozos del 2B al 2D son utilizados como control negativo (para obtener la actividad basal de la luciferasa en las TZM-b1 sin infectar), en cada pozo se añaden 100  $\mu$ L de DMEM-SFB 10%.
8. Los pozos del 3B al 3D son utilizados como control positivo de la infección (no se añade ningún elemento inhibidor, por lo tanto se obtiene un 100% de infección), por lo que se añaden solo 25  $\mu$ L de DMEM-SFB 10% en cada pozo de la serie.
9. A partir de la serie 4B-4D se llevan a cabo ensayos de neutralización. Mediante este diseño de placa es posible analizar ocho series de diluciones en escala 1:4 tal como se muestra en el esquema. Se añaden por triplicado, 25  $\mu$ L de anticuerpo de cada dilución en su serie correspondiente como se muestra en el esquema.



10. En todos los pozos excepto la serie 2B-2D, se añaden 75  $\mu\text{L}$  de virus (la concentración del virus añadido, se ha calculado para obtener lecturas en un orden de 10 veces por encima del control negativo en el ensayo de infectividad). La placa se coloca en un incubador a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire por 1 hora.
8. En todos los pozos se añaden  $10^4$  células TZM-bl en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  (obtenidas como esta descrito en los pasos del 1 al 5 de la sección de procedimiento de mantenimiento y pases, y cuantificación por el método de azul tripán y cámara de Neubauer). La placa se coloca en un incubador a 37° C en atmósfera saturada de humedad con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire por 72 horas.
9. Después de 72 horas de incubación, los sobrenadantes son removidos y la actividad celular asociada a luciferasa para cada pozo, es determinada en un luminómetro de microplacas (Turner biosystems, Sunnyvale, CA) mediante un luciferase assay kit (Biotherma, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante.
10. Se calcula el promedio del control negativo y este valor se elimina del resto de los valores; se obtiene el promedio del control positivo (3B-3D) y a partir de este valor, que representa el 100% se calcula el porcentaje que representan el resto de los valores; finalmente se calculan los promedios y desviaciones estándar por cada serie (el valor que resulta es el porcentaje  $[\pm\text{desviación estándar}]$  de actividad residual de la luciferasa, con estos datos se hace una curva y mediante regresión lineal se calcula la concentración de IgG que reduce la infectividad en un 50% ( $\text{IC}_{50}$ ).

### **7.9 Purificación de IgG y preparación de muestras para ensayos de neutralización**

La inmunoglobulina G fue extraída de las muestras seleccionados mediante cromatografía de afinidad con proteína G.

1. 100  $\mu$ L de suero inactivado (56° C/30 min) fue mezclado con 500  $\mu$ L de PBS pH 7,4 y la IgG fue purificada empleando mini-columnas de proteína G para micro-centrífuga siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL). La fracción residual (flow through) fue recogida y almacenada (para ensayos de neutralización, ver sección, 7.7 Ensayos de neutralización).
2. La IgG purificada fue posteriormente separada de elementos menores de 50 kDa mediante un proceso intensivo de diálisis, empleando membranas con tamaño máximo de poro de 50 kDa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Spectra/Por, Spectrum Medical Industries, Laguna Hills, CA).
3. La inmunoglobulina fue cuantificada usando un ensayo mini-Bradford. Las reacciones fueron leídas en un espectrofotómetro para micro-placas (Tecan Trading AG, Switzerland).
4. La fracción flow through, considerada libre de IgG, fue llevada a las diluciones 1:50 y 1:500 con respecto al volumen inicial de suero (100 $\mu$ L) para su posterior uso en ensayos de neutralización (ver sección 7.7 Ensayos de neutralización).

### **7.10 Ensayos in vitro para la detección de trazas de actividad antirretroviral por parte del antirretroviral efavirenz**

Se seleccionaron muestras de un paciente VIH-1+ en tratamiento antirretroviral sin efavirenz (EFV), el cual fue clasificado como un “neutralizante de amplio espectro” en base a los resultados de los ensayos de neutralización durante la etapa de cribado (screening), y confirmado posteriormente en ensayos de neutralización empleando IgG purificada. También se obtuvo una muestra de suero a partir de un paciente sano, no infectado. El EFV fue añadido a ambos tipos de sueros (infectado y sin infectar) a una concentración final de 5 µg/mL y se llevaron a incubación por 2 horas a 37° C. La fracción de inmunoglobulina G fue purificada/dializada como ya se ha descrito en el apartado 7.9 Purificación de IgG. Las fracciones flow-through fueron preservadas para ser incluidas en los análisis. Todas las fracciones fueron preparadas para llevar a cabo ensayos de neutralización, como se describe a continuación: Las IgGs (purificadas/dializadas) fueron cuantificadas y diluidas para obtener una concentración final de 0.2 mg/mL (al entrar en contacto con el virus); las muestras de suero inactivado por calor (56°C/30 min) y sus correspondientes fracciones flow-through fueron diluidas para obtener diluciones finales de 1:200 (al entrar en contacto con el virus). Todas las muestras (con y sin EFV) fueron divididas en dos alícuotas, una de las cuales fue hervida a 100° C por 30 minutos. Todas las fracciones fueron subsiguientemente evaluadas contra NL4-3, VI191 y el VSV-ENV-VIH-1 (arriba mencionado) en un ensayo de neutralización.

### **7.11 Análisis estadísticos**

Las variables fueron expresadas como promedios y rangos, o como proporciones según el caso. La asociación de los datos clínicos de cada paciente respecto la amplitud de neutralización, fue evaluada empleando la prueba de suma de rangos Wilcoxon. Ambas comparaciones fueron hechas tanto por paciente, tomando el resultado de la muestra seleccionada, y por muestra, es decir, tomando todas las muestras disponibles. Un análisis estratificado mediante la presencia o ausencia de terapia antirretroviral fue hecho mediante la evaluación de la asociación de los datos clínicos, y la amplitud de la neutralización en los pacientes bajo terapia antirretroviral y en aquellos sin tratamiento al momento de la toma de la muestra. La significancia estadística fue definida como un valor P de  $<0.05$ . Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el software informático SPSS (versión 16; SPSSInc., Chicago IL).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Definición del panel de virus

En este estudio de búsqueda de sueros neutralizantes, hemos usado un panel de 6 RVs del VIH-1, con la glicoproteína de superficie proveniente de diferentes subtipos y tropismos (tropismo entre paréntesis): VI191 subtipo A (R5), 92BR025 subtipo C (R5), 92UG024 subtipo D (X4), AC10 subtipo B (R5), CM244 subtipo AE (R5), y NL4-3 subtipo B (X4) (Tabla V). Estos RVs fueron usados en un ensayo de neutralización de VIH-1, basado en el sistema de la línea celular TZM-bl. Este ensayo de neutralización con RVs, ha sido previamente validado satisfactoriamente mediante una comparación con los actuales métodos estandarizados que emplean virus pseudotipados (Fenyo et al., 2009; Garcia-Perez et al., 2007; Gonzalez et al., 2010).

Con el propósito de determinar si los RVs del panel representaban adecuadamente la diversidad global del VIH-1, hemos llevado a cabo un análisis filogenético de los virus incluidos en nuestro panel, junto a un grupo de 135 secuencias de referencia de diferentes subtipos de VIH-1, tomadas de la base de datos de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). Análisis filogenéticos de la región V3C3 (del aminoácido 300 al 392, de acuerdo a la numeración de HxB2), demostraron que la diversidad de secuencia cubierta por los RVs del panel, es representativa de la

diversidad de los aislados VIH-1, que circulan entre las diferentes poblaciones humanas (Figura 4).

**Tabla IV.** Características clínicas de los grupos de pacientes.

Característica	Total	Pacientes en TARGA	Pacientes sin tratamiento
No. total (%) de pacientes	364	173 (47.5)	191 (52.5) <sup>a</sup>
No. (%) de pacientes por género			
Masculino	299 (82.1)	145 (83.8)	154 (80.6)
Femenino	65 (17.9)	28 (16.2)	37 (19.4)
No. (%) de pacientes en:			
TARGA incluyendo EFV	73 (42.2)	73 (42.2)	0 (0)
TARGA no incluyendo EFV	100 (57.8)	100 (57.8)	0 (0)
No. (%) de pacientes por grupo de riesgo			
Usuario de drogas intravenosas	27 (7.4)	15 (8.7)	12 (6.3)
Usuario de drogas intravenosas + HSH	8 (2.2)	6 (3.5)	2 (1.0)
Bisexual	4 (1.1)	2 (1.2)	2 (1.0)
Contacto heterosexual	90 (24.7)	44 (24.4)	46 (24.1)
Hemofílico	2 (0.5)	1 (0.6)	1 (0.5)
HSM	213 (58.5)	96 (55.5)	117 (61.3)
Transfusión	2 (0.5)	2 (1.2)	0 (0.0)
Sin información de la ruta de contagio	18 (4.9)	7 (4.0)	11 (5.8)
Edad promedio en años (rango)	42 (24 – 78)	41.5 (24 – 78)	40 (24 – 68)
Promedio del no. de copias de RNA/mL de plasma <sup>b</sup> (rango)	<50 (<50 – 222,117)	<50 (<50 – 85,454)	10,241 (<50 – 222,117)
Promedio del no. de células CD4 <sup>+</sup> /μL (rango)	663 (80 – 2,154)	689 (80 – 1,916)	567 (184 – 2,154)
Promedio del número de años desde el diagnóstico <sup>c</sup> (rango)	9 (0 – 24)	9 (1 – 24)	5 (0 – 24)
Promedio del número de años en TARGA	6 (0.1 – 17)	5 (0.1 – 13)	0 <sup>a</sup> (0 – 16)

<sup>a</sup> 33 de los pacientes sin tratamiento han estado bajo tratamiento, pero todos ellos han estado sin tratamiento los últimos 3 años. Para estos pacientes, el promedio del número de años en tratamiento es de 8 años con un rango de 3 a 16.

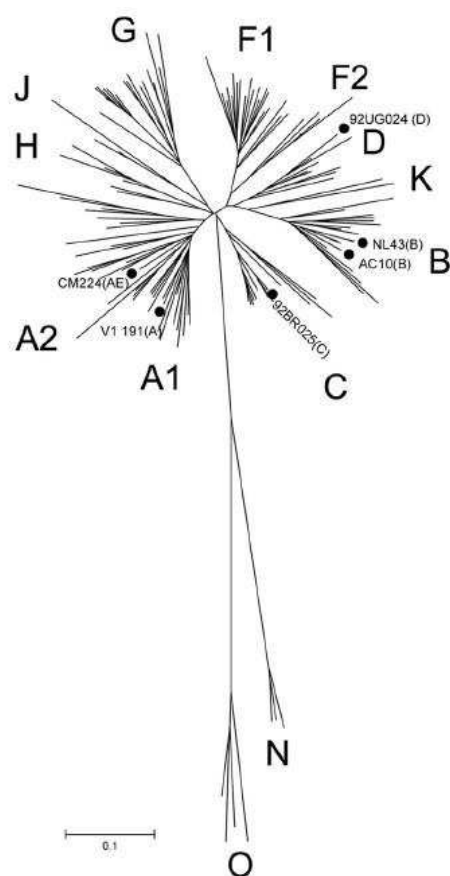
<sup>b</sup> El límite de detección fue de 50 copias de RNA/mL. La viremia fue indetectable en 167 pacientes en tratamiento y en 6 pacientes sin tratamiento.

<sup>c</sup> Se contó con la fecha de diagnóstico en 166 pacientes tratados y en 186 pacientes sin tratamiento.

También hemos evaluado el perfil general de resistencia/sensibilidad de nuestro modelo de neutralización, mediante la evaluación de la neutralización de nuestros RVs, contra un grupo de bNAbs con capacidades neutralizantes ampliamente estudiadas: b12, 2G12, 2F5, y 4E10 (Tabla V). Todos los virus de nuestro panel fueron sensibles a 4E10. Todos los virus excepto 92BR025 fueron sensibles a 2F5, y todos los virus excepto AC10 y CM244 fueron sensibles a b12 y 2G12.

**Tabla V.** Perfiles de neutralización de los virus recombinantes incluidos en el panel.

Virus	Subtipo	Tropismo	Perfil de Neutralización (IC <sub>90</sub> [mg/mL])			
			b12	2G12	2F5	4E10
VI 191	A	R5	0.2	5	1	0.4
NL 4-3	B	X4	0.3	0.5	2	2.5
AC10	B	R5	>6.25	>12.5	2	0.4
92BR025	C	R5	6	2	>12.5	7
92UG024	D	X4	3	1	4	4
CM224	AE	R5	>6.25	>12.5	2	2



**Figura 4.** Árbol filogenético de la región V3C3 del VIH-1, alineado mediante el método “neighbor-joining”, a partir de 135 secuencias de referencia, obtenidas de la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). También se incluyen seis secuencias a partir de virus recombinantes pertenecientes a varios subtipos (subtipo entre paréntesis): VI191 (A), 92BR025 (C), 92UG024 (D), AC10 (B), CM244 (AE), y NL 4-3 (B). Los círculos negros indican los virus incluidos en el panel. La barra de escala representa un 10% de distancia genética respecto a la secuencia nucleotídica.

## 8.2 Cribado inicial en la búsqueda de sueros polireactivos

Una vez establecido el panel de RVs, iniciamos la búsqueda de sueros con actividad neutralizante de amplio espectro. Nuestro grupo de muestras incluyó 508 sueros tomados a partir de 364 individuos VIH-1<sup>+</sup>; se analizó el suero de una sola toma en 235 individuos; para los 129 individuos restantes, se analizaron sueros de entre 2 y 4 muestras tomadas en diferentes puntos en el tiempo. Para aquellos pacientes con más de una muestra analizada, los períodos de tiempo entre una toma y otra, abarcaron entre 2 meses y hasta 8 años de separación. Cada combinación compuesta por una muestra de suero más un tipo de virus, fue analizada por triplicado a dos diluciones (1:200 y 1:2,000). Estas diluciones fueron elegidas con el propósito de minimizar el efecto inhibitorio de los antirretrovirales presentes en una parte de las muestras (Burrer et al., 2006; Dreyer et al., 1999).

**Tabla VI.** Resultados de los ensayos de neutralización para suero e IgG purificada

Grupo de pacientes	No. total (%) de muestra de suero (n = 508)	No. de muestras de suero (%) con un ID <sub>50</sub> de:			No. de muestras de IgG purificada (%) con un ID <sub>50</sub> de:		No. de muestras de suero ampliamente neutralizantes/no. total evaluado (%), considerando <sup>a</sup> :	
		>2,000	<2,000 y > 200	<200	>0.2 mg/mL	<0.2 mg/mL	Todas las muestras (n =508)	Una muestra por paciente (n =364)
Pacientes sin tratamiento	248 (42.8)	0 (0)	12 (4.8)	236 (95.1)	240 (96.8)	8 (3.2)	8/248 (3.2)	7/191 (3.7)
Pacientes en TARGA:							6/260 (2.3)	3/173 (1.7)
EFV	111 (21.9)	79 (71.2)	29 (29.1)	3 (1.2)	106 (95.5)	5 (4.5)		
Sin EFV	149 (29.3)	0 (0)	4 (2.7)	145 (97.3)	148 (99.3)	1 (0.7)		

<sup>a</sup> Una muestra de suero es considerada ampliamente neutralizante cuando, a una concentración de 0.2 mg/mL de su correspondiente fracción IgG, logra neutralizar a todos los virus del panel a un 50%, sin neutralización significativa en el control VIV-VIH-1-ENV.

La tabla 6 resume los resultados de los ensayos de neutralización para las 508 muestras de suero. Un total de 4.8% de las muestras tomadas de pacientes sin tratar (12 de 248), alcanzaron el 50% de neutralización de los 6 virus recombinantes del panel,



a una dilución de 1:200. Empleando estos sueros, se hicieron curvas completas de neutralización a partir de las cuales, se calcularon las diluciones recíprocas del suero que reducen la infectividad en un 50% (ID<sub>50</sub>s) (Tabla VII).

**Tabla VII.** Datos de la neutralización (ID<sub>50</sub>s) de pacientes sin tratamiento, capaces de neutralizar a todos los virus del panel<sup>a</sup>

<b>Paciente</b> \ <b>RV</b>	<b>AC10</b>	<b>92BR025</b>	<b>92UG024</b>	<b>CM244</b>	<b>VI 191</b>	<b>NL4-3</b>
528-010	500	2000	900	2000	2000	5000
734-000	250	6000	200	600	400	5000
521-005	250	400	200	1000	2500	5000
600-003	200	600	200	1000	600	2000
363-014	600	700	200	500	700	3000
642-007	700	600	600	1000	700	>6400
308-040*	250	350	350	250	300	6000

<sup>a</sup> \*, para el paciente 308, los valores de ID<sub>50</sub> fueron calculados a partir de la segunda muestra colectada, esto debido a la limitada cantidad de suero disponible de la primera toma. Los números indican la ID<sub>50</sub>. El cuadro amarillo indica una ID<sub>50</sub> de  $\geq 200$  pero  $< 1,000$ , el cuadro naranja indica una ID<sub>50</sub> de  $\geq 1,000$  pero  $< 2,000$ , y el cuadro rojo indica una ID<sub>50</sub>  $\geq 2,000$ .

Para pacientes en los cuales se analizaron muestras tomadas en varios puntos en el tiempo, las curvas de neutralización fueron hechas solo a partir de la primera toma. La actividad neutralizante más notable detectada en este estudio fue observada en los pacientes con tratamiento antirretroviral, en los cuales, 112 muestras de suero (43.1%) alcanzaron el 50% de neutralización de todos los virus del panel (33 a una dilución 1:200 y 79 a una dilución 1:2,000). Un análisis detallado de estas muestras y sus correspondientes regímenes de tratamiento revelaron una fuerte correlación entre los pacientes tratados con el antirretroviral efavirenz (EFV) y la inhibición viral. De hecho, el 97.3% (108 de 111) de las muestras de sueros a partir de pacientes que incluían EFV en su tratamiento, fueron capaces de neutralizar todos los virus del panel (29 a una dilución de 1:200 y 79 a una dilución de 1:2,000). Estos resultados nos condujeron a

cuestionar una posible actividad inhibitoria atribuible a niveles residuales del antirretroviral en el suero.

### **8.3 Purificación de IgG a partir de sueros conteniendo efavirenz**

Considerando la fuerte asociación observada entre los tratamientos conteniendo EFV y la inhibición viral, llevamos a cabo ensayos in vitro para evaluar la eficiencia de nuestro sistema de purificación de IgG, respecto a la remoción de trazas de EFV, y para excluir el efecto del fármaco. En estos ensayos, se añadió EFV (5  $\mu\text{g/mL}$ ) a una muestra de suero VIH-1<sup>+</sup> y a una muestra de suero negativa para VIH-1 (VIH<sup>-</sup>). La concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$  fue elegida por ser más alta que la concentración más alta previamente publicada en pacientes tratados con EFV (Mallon et al., 2003; Marzolini et al., 2001). Subsiguientemente, los sueros formulados artificialmente con EFV (y los correspondientes controles sin antirretroviral), fueron incubados a 37° C con el propósito de facilitar la asociación de EFV con las proteínas del suero y a la vez, para estandarizar estos ensayos con el resto llevados a cabo durante la fase de screening. Después de 2 h de incubación a 37° C, la fracción de IgG fue purificada y extensamente dializada mediante una membrana de tamaño máximo de poro de 50-kDa. Las actividades inhibitorias de cada muestra de suero antes y después de la adición de EFV, de la IgG purificada, y de la fracción residual de la purificación (flow-through), fueron analizadas mediante un ensayo de neutralización, tal como se ha descrito previamente. Cada fracción fue evaluada contra dos virus del panel (VI191 y NL4-3). El VSV-ENV-VIH-1 fue incluido en los ensayos de neutralización como un control de actividad neutralizante

no específica. Los resultados se muestran en la Tabla VIII. Tanto el suero VIH-1<sup>+</sup> como el VIH<sup>-</sup>, fueron capaces de inhibir la replicación de NL4-3, VI191, y VSV-ENV-VIH-1 después de la adición de EFV. El análisis de la fracción purificada de IgG no demostró inhibición atribuible al fármaco. Además, las fracciones residuales de purificación de IgG a partir de muestras a las que se les había añadido EFV, mostraron una fuerte inhibición de los tres virus.

**Tabla VIII.** Evaluación del método de purificación empleado para aislar la fracción IgG a partir de los sueros que contienen EFV<sup>a</sup>

	Neutralización con suero (1:200)			Neutralización con IgG (0.2 mg/mL)			Neutralización con flowthrough (1:5)		
	VSV	NL4-3	VI 191	VSV	NL4-3	VI 191	VSV	NL4-3	VI 191
VIH-1 (+)	75.8±2.1	2.1±2.3	48.4±2.6	67.1±2.2	1.7±0.9	49.1±11.3	90.8±5.1	45.2±15.7	71.8±10.9
VIH-1 (+) + EFV	0.0±0.1	0.1±0.1	0.5±0.2	69.8±11.6	0.4±0.3	30.6±1.4	0.1±0.0	0.0±0.0	0.1±0.3
VIH-1 (-)	69.6±3.6	78.0±19.8	91.8±18.9	84.4±6.9	68.4±11.4	82.5±2.7	62.8±0.3	58.6±1.7	55.6±11.9
VIH-1 (-) + EFV	0.1±0.1	0.1±0.0	0.0±0.2	75.8±5.2	64.9±9.7	72.6±8.6	0.1±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3
VIH-1(+) inactivado a 100° C	73.4±13.8	50.2±3.5	33.9±12.2	103.7±11.1	91.8±9.0	138.6±11.0	98.4±5.9	109.3±37.9	100.8±28.2
VIH-1(+) inactivado a 100° C+EFV	0.0±0.1	0.1±0.0	0.1±0.1	104.6±6.5	113.0±11.2	153.1±6.9	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.4
VIH-1(-) inactivado a 100° C	101.8±3.5	70.8±4.1	120.8±3.4	91.8±7.1	84.9±6.7	124.8±1.9	91.3±38.4	41.3±0.3	51.5±15.4
VIH-1(-) inactivado a 100° C+EFV	0.1±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1	103.1±10.2	88.3±14.2	132.5±17.4	0.0±0.0	0.0±0.1	0.2±0.4

<sup>a</sup> Las cifras indican el porcentaje de la actividad de la luciferasa (cuentas por segundo ± la desviación estándar). El cuadro blanco indica >50% de actividad de luciferasa, el cuadro amarillo indica <50% de actividad de luciferasa pero >30%, y el cuadro rojo indica <10% de actividad de luciferasa.

Previamente se ha comprobado que la actividad inhibitoria de EFV en suero, es altamente resistente a la inactivación por temperatura (Burrer et al., 2006), más aún cuando se compara con la actividad inhibitoria mediada por proteína. Con el propósito de determinar el efecto de EFV, en ausencia de la actividad mediada por IgG, llevamos a cabo un ensayo donde sometimos nuestros sueros formulados, a un proceso de inactivación proteica de 100° C por 30 min. Después de la inactivación, se probó la actividad neutralizante de cada formulado en ensayos de neutralización empleando los virus NL4-3, VI191 y VSV-ENV-VIH-1. El análisis de los datos obtenidos reveló que todas las fracciones conteniendo EFV, retuvieron la actividad neutralizante aún después

de la inactivación por calor. También se observó que no hubo efecto atribuible al fármaco en las fracciones que contenían únicamente IgG purificada (Tabla VIII).

#### **8.4 Confirmación de que hay actividad neutralizante de amplio espectro atribuible a la fracción IgG del suero**

Con el propósito de identificar la actividad neutralizante de amplio espectro asociada a la fracción IgG, aislamos la fracción IgG de los sueros que alcanzaron un 50% de neutralización, en los 6 virus recombinantes a una dilución de suero de 1:200 (suero a partir de pacientes sin tratamiento y pacientes tratados con antirretrovirales pero sin EFV), y a una dilución de 1:2,000 (pacientes en tratamiento que incluye EFV). Las IgGs purificadas fueron evaluadas contra los 6 virus recombinantes y contra VSV-ENV-VIH-1 como control. Mediante este análisis, fuimos capaces de identificar 14 fracciones de IgG purificadas a partir de 12 pacientes que fueron capaces de alcanzar un 50% de neutralización contra todos los virus del panel, a una concentración de 0.2 mg/mL, correspondiente a un rango de dilución de entre 1:40 y 1:80, dependiendo de la muestra de suero (tabla VI). Dos pacientes (521 y 308) mostraron una buena respuesta neutralizante en muestras de suero tomadas a distintos tiempos. Los resultados para estas IgGs se muestran en la Tabla IX.

**Tabla IX.** Resultados de los ensayos de neutralización, empleando la fracción IgG purificada (0.2 mg/mL), a partir de pacientes capaces de neutralizar todos los virus del panel<sup>a</sup>

	VI 191 (A)	NL4-3 (B)	AC10 (B)	92BR025 (C)	90UG024 (D)	CM244 (E)	VSV
528-010	49.1±11.3	1.7±0.9	13.4±2.7	6.8±3.0	7.1±5.3	13.8±1.1	67.1±2.2
734-000	17.9±3.7	0.1±0.3	28.0±5.1	2.1±0.1	21.4±9.6	38.9±3.9	58.7±2.6
521-005	26.3±7.1	2.1±1.4	27.1±2.7	30.8±4.7	23.3±2.9	16.6±1.0	70.0±2.4
600-003	28.6±3.5	3.1±0.7	44.2±8.2	13.1±5.0	42.5±21.9	22.9±0.8	54.1±6.6
363-014	26.7±14.4	2.4±0.3	15.9±3.7	14.8±0.4	35.5±18.4	24.4±2.5	50.5±3.3
541-011	34.9±4.0	4.5±0.5	40.6±6.0	26.3±1.8	46.4±2.7	48.5±2.7	62.6±4.8
181-036	40.6±10.2	14.6±3.1	46.6±1.3	26.2±10.5	43.5±18.6	27.6±3.3	94.2±14.2
488-013	16.9±1.9	1.2±0.8	48.7±9.9	13.9±2.3	36.7±18.1	46.9±2.6	77.9±4.4
642-007	27.8±9.8	3.7±2.7	16.7±2.7	27.7±7.5	44.6±7.4	26.9±3.5	96.5±2.2
308-031	17.5±1.4	1.7±1.2	9.1±4.4	9.1±2.2	20.8±3.6	33.0±6.2	85.7±4.5
331-030	32.4±2.4	5.8±0.7	25.0±6.6	14.7±2.6	38.5±3.7	42.8±5.9	63.7±9.1
634-005	44.2±6.0	6.0±6.7	45.1±12.0	42.4±9.2	49.5±11.4	23.8±1.9	103.1±5.9

<sup>a</sup> Las cifras indican el porcentaje de la actividad de la luciferasa (cuentas por segundo ± la desviación estándar). El cuadro blanco indica >50% de actividad de luciferasa, el cuadro amarillo indica <50% de actividad de luciferasa pero >30%, y el cuadro rojo indica <10% de actividad de luciferasa. Para los pacientes 521 y 308, se muestran solo los datos de la primera toma de muestra.

Con el propósito de descartar el efecto de unas posibles trazas de EFV contenidas en el suero, sometimos a todas las fracciones de IgG a un proceso de inactivación por calor (100° C/30 min), y las evaluamos contra dos de los virus del panel (NL4-3 y VI191). No se observó actividad neutralizante después de la inactivación por calor (datos no mostrados). Estos resultados indican que la neutralización observada en la fracción purificada de IgG, a partir de sueros de pacientes tratados con EFV, no fue atribuible a la presencia de trazas de EFV.

Hemos encontrado actividad neutralizante en los dos grupos de pacientes: pacientes sin tratamiento y pacientes bajo tratamiento antirretroviral. El porcentaje de actividad neutralizante de amplio espectro en pacientes sin tratamiento fue del 3.7% (7 de 191). El porcentaje de actividad neutralizante de amplio espectro en pacientes con tratamiento fue similar: 1.7% (3 de 174; P = 0.34). En este análisis, hemos incluido datos obtenidos solo a partir de la primera toma de muestra para pacientes con más de una toma (n = 364). Porcentajes similares fueron obtenidos cuando se consideraron

todas las muestras de suero ( $n = 508$ ), con porcentajes de neutralización de amplio espectro de 2.3% (6 de 260) en suero de pacientes tratados, y 3.2% (8 de 248) en pacientes sin tratamiento ( $P = 0.59$ ). Los resultados se muestran en la Tabla VI.

### **8.5 Estabilidad de la respuesta neutralizante de amplio espectro asociada a IgG**

Se analizaron todos los sueros de 7 pacientes con más de una muestra. En estos pacientes, las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos en períodos que abarcan desde 2 meses hasta 4 años. La estabilidad en la respuesta neutralizante para estos pacientes se muestra en la Tabla X. Dos de estos pacientes (488 y 331), desarrollaron la actividad neutralizante durante el curso del estudio. En contraste, los pacientes 363, 181, y 634, tuvieron una buena actividad neutralizante en la primera muestra pero no mostraron más actividad a partir de la segunda. Dos de los pacientes (521 y 308) mostraron una buena actividad neutralizante que se mantuvo estable durante el curso del estudio. Resulto especialmente significativo el caso del paciente 308, quien mostró una buena y estable respuesta neutralizante durante un período de 4 años.

**Tabla X.** Características clínicas de los pacientes que mostraron actividad neutralizante de amplio espectro, asociada a IgG, en una o más muestras tomadas a distintos tiempos.

Paciente	Muestra	Meses de estudio	bNAb (IgG) <sup>a</sup>	CD4 <sup>+</sup> (células/mL)	CD8 <sup>+</sup> (células/mL)	Carga viral <sup>b</sup>	Pico de carga viral	CD4 nadir (células/mL)	
528	010	0	+	750	1,024	26,000	104,000	354	
734	000	0	+	500	942	1,422	1,422	491	
521	005	0	+	559	2,163	2,232	1000,000	222	
	006	15	+	637	2,240	3,455	1000,000	222	
600	003	0	+	1,608	1,366	2,440	297,000	1,008	
363	014	0	+	581	664	7,367	7,367	537	
	015	12	-	686	987	7,950	7,950	537	
541	011	0	+	499	576	<50	78,339	286	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir
181	036	0	+	437	857	<50	39,947	266	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir
488	012	0	-	344	998	975	3,038	334	
	013	17	+	295	1,042	<50	5,188	291	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir
642	007	0	+	272	799	89,356	107,300	272	
308	031	0	+	583	2,435	9,003	12,069	460	
	040	35	+	448	2,304	19,005	19,005	448	
	041	49	+	530	1,698	49	27,462	410	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir
331	029	0	-	80	770	85,454	460,000	80	Zidovudina + lopinavir + ritonavir + emtricitabina + tenofovir
	030	2	+	75	1,101	509	85,454	75	Zidovudina + lopinavir + ritonavir + emtricitabina + tenofovir
634	005	0	+	686	1,291	<50	134,500	378	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir
	006	4	-	587	1,522	-	134,500	378	Efavirenz + emtricitabina + tenofovir

<sup>a</sup> +, La fracción IgG correspondiente neutraliza a todos los virus del panel a un 50%, sin neutralización significativa del control VSV-ENV-VIH-1, cuando se usa una concentración de 0.2 mg/mL; -, la correspondiente fracción de IgG, no neutraliza todos los virus del panel a un 50%.

<sup>b</sup> El límite de detección fue de 50 copias/mL.

### 8.6 La inducción de la actividad neutralizante no se correlaciona con la carga viral cuando los pacientes en tratamiento antirretroviral son incluidos en el estudio

Los datos clínicos y demográficos de todos los pacientes, fueron comparados con respecto a la presencia de actividad neutralizante de amplio espectro. En la Tabla X, se muestra información clínica correspondiente a 12 pacientes que mostraron neutralización de amplio espectro mediada por IgG, en una o más de una muestra tomadas a distintos tiempos. Para este análisis nosotros hemos considerado la muestra de suero como ampliamente neutralizante, cuando su correspondiente fracción de IgG neutraliza al 50% a todos los virus del panel, y verificando que no se neutralice

al control VSV-ENV-VIH-1, a una concentración de 0.2 mg/mL. Las asociaciones entre amplitud de neutralización y las covariantes clínicas fueron evaluadas mediante el uso de métodos no paramétricos (prueba de suma de rangos Wilcoxon). En nuestro panel de sueros, no se encontró asociación entre la carga viral y la amplitud de neutralización. Tampoco encontramos asociación entre la amplitud de neutralización y las cuentas de CD8<sup>+</sup>, número de años bajo tratamiento, número de años desde el diagnóstico, grupo de riesgo, género, o edad. También hicimos el mismo análisis considerando únicamente una muestra por paciente (n = 364). En este otro análisis (incluyendo los dos grupos de paciente), tampoco encontramos asociación alguna entre la amplitud de respuesta y las cuentas de células T CD4<sup>+</sup>, cuentas de CD8<sup>+</sup>, número de años bajo tratamiento, número de años desde el diagnóstico, grupo de riesgo, género, o edad.



## 9. DISCUSIÓN

La inducción de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, es un punto crítico en el camino hacia el desarrollo de una vacuna contra el VIH. Nuestro trabajo muestra los resultados de búsqueda de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, llevada a cabo por primera vez a gran escala, empleando pacientes bajo tratamiento antirretroviral. Antes de la era de la TARGA, fue ampliamente publicado que la infección por VIH conduce a una extensa serie de defectos en el sistema inmune humoral (Ammann et al., 1984; Carbone et al., 1985; Kekow et al., 1986; Lane et al., 1983; Overton et al., 2005). Ya durante la era de la TARGA, se pudo demostrar que la mayoría de los defectos sufridos por las células B, pueden ser revertidos gracias al tratamiento (Cagigi et al., 2008; Deeks et al., 2006; Moir and Fauci, 2009; Morris et al., 1998). En el presente estudio, hemos demostrado pacientes en tratamiento antirretroviral son capaces de inducir respuesta de bNAbs contra VIH-1, a pesar de mantener niveles indetectables de carga viral en suero. En el presente estudio, un grupo de secuencias que codifican para las glicoproteínas de superficie del VIH-1 fueron filogenéticamente analizadas, y 6 de dichas secuencias a partir de 5 diferentes subtipos fueron seleccionadas para generar un panel de virus recombinantes. Los análisis filogenéticos demostraron que este grupo de secuencias conforman una buena representación de la variación global del VIH-1, incluyendo una diversidad similar comparada con paneles utilizados en otros estudios (Doria-Rose et al., 2009; Euler et al., 2010; Simek et al., 2009). Diferentes grupos de

investigación han evaluado la actividad neutralizante en muestras de plasma o suero a partir de grupos grandes de individuos, siempre frente a paneles compuestos de virus de diferentes subtipos para verificar la reactividad cruzada. Estudios han demostrado que paneles compuestos por incluso 5 distintos subtipos, pueden proveer de la misma información que se obtiene utilizando paneles compuestos de muchos subtipos (Doria-Rose et al., 2009; Euler et al., 2010; Simek et al., 2009).

En nuestro estudio, la prevalencia de pacientes con bNAbs fue más baja comparada a lo observado en estudios previos. Un total de 2.7% de los pacientes mostraron actividad neutralizante mediada por IgG contra los 5 diferentes subtipos representados en el panel de 6 virus recombinantes. Las diferencias de prevalencia de reactividad cruzada observada en nuestro estudio, comparado a estudios previos, son probablemente debidas al uso de un criterio de selección más estricto. Todos los estudios anteriores han empleado un criterio de selección basado en la obtención de una  $ID_{50}$  de  $> 100$ , y se han considerado como sueros ampliamente neutralizantes a aquellos que logran una neutralización a partir de 2, 3, 4, ó 5 diferentes subtipos, dependiendo del estudio. En este estudio, el parámetro inicial de selección tanto para pacientes sin tratamiento como para aquellos tratados pero sin EFV, fue más alto que cualquiera empleado anteriormente ( $ID_{50} > 200$ ). Para los pacientes en tratamiento incluyendo EFV, el criterio de selección fue aun más restrictivo ( $ID_{50} > 2,000$ ) debido a la inhibición no específica observada en las muestras de suero de esos pacientes.

Para las muestras de IgG purificadas a partir de los sueros seleccionados, nosotros definimos un criterio de selección de  $IC_{50} < 0.2$  mg/mL de IgG purificada. Un reducido número de pacientes con actividad neutralizante de amplio espectro, ha sido previamente descrito. Sin embargo, la mayoría de pacientes LTNP muestran una respuesta inmune humoral pobre (Humbert et al., 2007; Wang et al., 2008). Varios estudios han comparado la inducción de bNAbs entre LTNPs y pacientes progresores con niveles detectables de viremia (Bailey et al., 2006c; Doria-Rose et al., 2009; Doria-Rose et al., 2010; Lambotte et al., 2009; Mahalanabis et al., 2009; Pereyra et al., 2008). Entre los pacientes progresores, se han encontrado individuos con potentes respuestas neutralizantes, en contraste con lo observado en pacientes LTNP. Esta ineficiente respuesta neutralizante ha sido atribuida a los bajos niveles de estimulación antigénica. De hecho, varios estudios han mostrado una correlación positiva entre la carga viral en plasma y los títulos de anticuerpos neutralizantes contra virus heterólogos (De et al., 2004; Doria-Rose et al., 2010; Piantadosi et al., 2009; Sather et al., 2009), sugiriendo que el desarrollo de esos anticuerpos fue en consecuencia de la replicación viral.

En el presente estudio, hemos examinado la amplitud de neutralización en un extenso grupo de pacientes, incluyendo pacientes en TARGA con niveles indetectables de viremia estables. Sorprendentemente, hemos encontrado un porcentaje similar respecto a amplitud de respuesta, en suero de pacientes en tratamiento con cargas virales por debajo de las 50 copias de RNA por mL de plasma (1.7%) y pacientes sin tratamiento con niveles detectables de viremia (3.7%). Estos resultados indican que los niveles de antígeno requeridos para el desarrollo de bNAbs en pacientes tratados, bajo

ciertas condiciones pueden ser muy bajos, incluso por debajo del límite de las pruebas rutinarias de detección.

Nosotros hemos probado por primera vez que ciertos pacientes, aun bajo tratamiento, son capaces de generar bNAbs. Nuestros resultados contrastan directamente con la información de otros grupos, obtenida a partir de grupos pequeños de individuos compuestos por pacientes en TARGA y también pacientes clasificados como LTNP. En esos estudios, la pobre respuesta neutralizante en esos grupos de pacientes había sido atribuida a los bajos niveles de replicación viral. Nuestros resultados complementan los encontrados por otros grupos que anteriormente habían propuesto que la inducción de respuestas fuertes de NAbs durante una infección primaria por VIH-1 debería requerir, en principio, un estrecho contacto con el virus, seguido de la supresión de la replicación de los virus mediante TARGA para permitir la recuperación de la competencia inmunológica y finalmente, nuevas exposiciones a glicoproteínas de superficie nativa (Binley et al., 2000; Joos et al., 2005; Kimura et al., 2002). Sin embargo, aun hacen falta más pruebas para confirmar lo anterior. En nuestro trabajo, hicimos un estudio longitudinal donde el suero de dos pacientes fue analizado antes y después del inicio del tratamiento. El paciente 308 tenía bNAbs antes de iniciar el tratamiento, al contrario del paciente 488. Los datos de este estudio longitudinal no son aun lo suficientemente completos como para confirmar o descartar completamente, la hipótesis propuesta por los mencionados grupos. Sin embargo, la información provista resulta de gran utilidad y un estudio respecto del estatus de células B, podría proporcionar respuestas definitivas.

Existe muy poca información respecto al estatus de células B en pacientes con cargas virales indetectables. Titanji et al. (Titanji et al., 2006), investigaron la memoria serológica hacia antígenos no relacionados con VIH-1, en diferentes grupos de pacientes infectados por VIH-1. Ellos encontraron que mientras los pacientes progresores reflejaron defectos severos respecto a la memoria serológica, los pacientes LTNP mantuvieron frecuencias de células B y niveles de anticuerpos específicos comparables a los del grupo control de individuos no infectados. De acuerdo a este estudio, los LTNPs no mostraron defectos en las células B, los cuales pudieran explicar la deficiente respuesta humoral contra el VIH-1. Otra posible explicación para las diferencias en la inducción de bNAbs entre pacientes con tratamiento y los LTNPs, sería que los niveles de replicación viral fuesen más altos en pacientes tratados en comparación con los LTNPs, aun cuando ambos grupos de pacientes mantienen cargas virales por debajo del límite de detección (Perelson et al., 1997). De hecho, la presencia de bajos niveles de viremia detectable mediante ensayos más sensibles (Dornadula et al., 1999; Furtado et al., 1999; Havlir et al., 2003; Maldarelli et al., 2007; Palmer et al., 2008; Pereyra et al., 2008) ha sido constantemente demostrada en la mayoría de pacientes en TARGA, sin embargo, el lugar donde se originan de estos virus permanece sin identificar. Si bien es verdad, los pacientes en TARGA, por lo general, mantienen altos niveles de viremia previo a la iniciación del tratamiento, lo cual contribuye al establecimiento de reservorios celulares. Los bajos niveles de viremia deben surgir a partir de la expresión viral en los reservorios celulares establecidos previo al inicio de la TARGA (Bailey et al., 2006b; Havlir et al., 2001; Havlir et al., 2003; Hermankova et al., 2001; Kieffer et al., 2004; Nettles et al., 2005; Palmer et al., 2008; Persaud et al., 2004; Tobin et al.,

2005) o a partir de bajos niveles de ciclos completos de replicación viral (Cohen Stuart et al., 2001; Coiras et al., 2009; Tobin et al., 2005).

La observación de que las glicoproteínas de superficie del VIH-1, predominantemente inducen anticuerpos en plasma dependientes de células B de memoria de vida corta (Bonsignori et al., 2009), refuerza la idea de que bajos niveles de viremia podrían ser requeridos para la inducción de bNAbs en pacientes tratados. La continua replicación viral durante largos períodos de supresión viral mediante la TARGA, está respaldada por hallazgos de evolución en la secuencia con la aparición de nuevas variantes resistentes a los fármacos en un subgrupo de pacientes durante la aplicación, aparentemente exitosa de la TARGA (Cohen Stuart et al., 2001; Tobin et al., 2005), así como también se refleja con la disminución de la viremia en plasma cuando se intensifica el tratamiento (Havlir et al., 2003).

En contraste, poco se sabe acerca de la replicación viral en LTNPs con niveles de viremia por debajo de las 50 copias/mL. Varios estudios sugieren que la infección con virus que presentan defectos en la replicación, explican la ausencia de virus circulante detectable en algunos LTNPs (Candotti et al., 1999; Kloosterboer et al., 2005; Learmont et al., 1999; Lum et al., 2003; Wang et al., 2003). Estos pacientes podrían tener una ineficiente estimulación de sus células B, causada por la misma replicación viral deficiente. Sin embargo, esto no explica la baja respuesta neutralizante en LTNPs infectados por virus que no presentan defectos de replicación, en quienes el control de la replicación es atribuido a mecanismos genéticos o inmunológicos particulares del

hospedador (Bailey et al., 2006c; Cao et al., 1995; Hunt et al., 2008; Lambotte et al., 2005; Migueles et al., 2000; Migueles et al., 2002). En este estudio hemos identificado dos pacientes con respuestas neutralizantes de amplio espectro, las cuales han sido mantenidas de forma estable por períodos de hasta 4 años. La identificación y análisis detallado de estos pacientes podría proveer de valiosa información para mejorar nuestros conocimientos respecto a cómo inducir una respuesta humoral efectiva y estable.

En contraste con estudios previos (Piantadosi et al., 2009; Sather et al., 2009), nosotros no hemos observado una correlación entre la amplitud de respuesta neutralizante y la carga viral. Trabajos anteriores que correlacionaron la carga viral y la amplitud de respuesta neutralizante, sugerían que una vacuna necesitaría proveer de antígenos virales por largos períodos de tiempo para permitir la maduración de los anticuerpos y en consecuencia, el desarrollo de respuestas neutralizantes de amplio espectro. Esta sugerencia fue reforzada por la observación de que los bNAbs contra VIH-1, a menudo muestran significativos grados de maduración de la afinidad (Pancera et al., 2010; Scheid et al., 2009). Más investigación será necesaria para esclarecer si tal grado de maduración requiere varios años de exposición a antígenos.

A la fecha, ningún bNAb ha sido aislado a partir de pacientes en tratamiento. Por lo tanto, el nivel de maduración de esos anticuerpos es desconocido. Los resultados del presente estudio sugieren que el requerimiento de altos niveles de replicación viral, para la inducción de bNAbs, podría ser solo necesario para el caso de individuos infectados sin tratar, los cuales habrían de padecer de varias anormalidades en sus células B,

causadas por la activación celular del sistema inmune asociadas al virus. Por el contrario, tales altos niveles de replicación viral, no siempre serían necesarios para individuos no infectados o en pacientes en TARGA (p. ej., en ensayos de vacunas).

En este estudio también hemos observado que las trazas de fármacos antivirales presentes en el suero de pacientes tratados, mostraron un fuerte efecto inhibitorio en la replicación del virus. Específicamente, hemos observado tal efecto para el caso del antirretroviral efavirenz. Con el propósito de separar el efecto de las trazas de fármacos antivirales o cualquier otro factor no específico presente en el suero, respecto al efecto inhibitorio mediado por IgGs, decidimos purificar la fracción IgG a partir de todos los sueros que mostraron una buena inhibición viral y analizamos sus actividades neutralizantes. Hemos sido capaces de confirmar la presencia de actividad neutralizante asociada a IgG, en 5 muestras de suero procedentes de pacientes tratados con EFV. También hemos sido capaces de descartar el efecto de las trazas de EFV en esas muestras de IgG, después de observar que la actividad mediada por las IgGs, no ejerció efecto alguno sobre el control de especificidad VSV-ENV-VIH-1 (Tabla VIII) y también, después de observar que el efecto inhibitorio desapareció después de la inactivación por calor (100° C/30 min).

La observación acerca de qué factores solubles presentes en el suero, pueden tener un efecto inhibitorio sobre el virus, sugiere que la evaluación de la neutralización de VIH-1, mediante muestras de suero o plasma, deben ser llevadas a cabo bajo ciertas precauciones.



## 10. CONCLUSIONES

La evaluación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro contra VIH-1, en pacientes bajo tratamiento antirretroviral con carga viral indetectable, demostró que es posible una inducción de tales anticuerpos en este particular grupo de pacientes aún cuando mantienen tasas indetectables de viremia.

Nuestros resultados contrastan directamente con lo que previamente se había publicado al respecto, sin embargo, nuestras observaciones fueron firmemente sustentadas mediante un estricto ensayo de neutralización, el cual fue hecho a gran escala, a diferencia de otros trabajos, y empleando un panel de virus recombinantes, diseñado para representar la diversidad global del VIH-1.

Los hallazgos expuestos en este trabajo, indican que una replicación viral residual, en combinación con unas mejoradas funciones de las células B en pacientes bajo tratamiento, son dos factores determinantes para la inducción de respuestas de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, similares a las respuestas inducidas en pacientes no tratados, con cargas detectables de viremia.

## 11. LITERATURA CITADA

HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDS. (2003). *Drugs R. D.* 4, 249-253.

Alizon,M., Wain-Hobson,S., Montagnier,L., and Sonigo,P. (1986). Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 46, 63-74.

Ammann,A.J., Schiffman,G., Abrams,D., Volberding,P., Ziegler,J., and Conant,M. (1984). B-cell immunodeficiency in acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 251, 1447-1449.

An,W. and Telesnitsky,A. (2002). HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Rev.* 4, 195-212.

Autran,B., Carcelain,G., Li,T.S., Blanc,C., Mathez,D., Tubiana,R., Katlama,C., Debre,P., and Leibowitch,J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277, 112-116.

Autran,B., Carcelain,G., Li,T.S., Gorochov,G., Blanc,C., Renaud,M., Durali,M., Mathez,D., Calvez,V., Leibowitch,J., Katlama,C., and Debre,P. (1999). Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol. Lett.* 66, 207-211.

Bailey,J.R., Lassen,K.G., Yang,H.C., Quinn,T.C., Ray,S.C., Blankson,J.N., and Siliciano,R.F. (2006a). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 80, 4758-4770.

Bailey,J.R., Sedaghat,A.R., Kieffer,T., Brennan,T., Lee,P.K., Wind-Rotolo,M., Haggerty,C.M., Kamireddi,A.R., Liu,Y., Lee,J., Persaud,D., Gallant,J.E., Cofrancesco,J., Jr., Quinn,T.C., Wilke,C.O., Ray,S.C., Siliciano,J.D., Nettles,R.E., and Siliciano,R.F. (2006b). Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J. Virol.* 80, 6441-6457.

Bailey,J.R., Williams,T.M., Siliciano,R.F., and Blankson,J.N. (2006c). Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* 203, 1357-1369.

Barbas,C.F., III, Bjorling,E., Chiodi,F., Dunlop,N., Cababa,D., Jones,T.M., Zebedee,S.L., Persson,M.A., Nara,P.L., Norrby,E., and . (1992). Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9339-9343.

Barin,F., M'Boup,S., Denis,F., Kanki,P., Allan,J.S., Lee,T.H., and Essex,M. (1985). Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 2, 1387-1389.

Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C., Rozenbaum,W., and Montagnier,L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Benn,S., Rutledge,R., Folks,T., Gold,J., Baker,L., McCormick,J., Feorino,P., Piot,P., Quinn,T., and Martin,M. (1985). Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 230, 949-951.

Berman,P.W., Groopman,J.E., Gregory,T., Clapham,P.R., Weiss,R.A., Ferriani,R., Riddle,L., Shimasaki,C., Lucas,C., Lasky,L.A., and . (1988). Human immunodeficiency virus type 1 challenge of chimpanzees immunized with recombinant envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 5200-5204.

Binley,J.M., Trkola,A., Ketas,T., Schiller,D., Clas,B., Little,S., Richman,D., Hurley,A., Markowitz,M., and Moore,J.P. (2000). The effect of highly active antiretroviral therapy on binding and neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 182, 945-949.

Bonsignori,M., Moody,M.A., Parks,R.J., Holl,T.M., Kelsoe,G., Hicks,C.B., Vandergrift,N., Tomaras,G.D., and Haynes,B.F. (2009). HIV-1 envelope induces memory B cell responses that correlate with plasma antibody levels after envelope gp120 protein vaccination or HIV-1 infection. *J. Immunol.* 183, 2708-2717.

Briones,C. and Domingo,E. (2008). Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev.* 10, 93-109.

Buchbinder,S.P., Mehrotra,D.V., Duerr,A., Fitzgerald,D.W., Mogg,R., Li,D., Gilbert,P.B., Lama,J.R., Marmor,M., Del,R.C., McElrath,M.J., Casimiro,D.R., Gottesdiener,K.M., Chodakewitz,J.A., Corey,L., and Robertson,M.N. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372, 1881-1893.

Burrer,R., Spiridon,G., Einius-Haessig,S., Richert,S., Salmon-Ceron,D., Pancino,G., Aubertin,A.M., and Moog,C. (2006). Efavirenz in plasma from HIV-infected patients does not directly block reverse transcriptase activity in cell-free assays but inhibits HIV replication in cellular assays. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 865-869.

Burton,D.R., Barbas,C.F., III, Persson,M.A., Koenig,S., Chanock,R.M., and Lerner,R.A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10134-10137.

Burton,D.R., Desrosiers,R.C., Doms,R.W., Koff,W.C., Kwong,P.D., Moore,J.P., Nabel,G.J., Sodroski,J., Wilson,I.A., and Wyatt,R.T. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat. Immunol.* 5, 233-236.

Burton,D.R., Pyati,J., Koduri,R., Sharp,S.J., Thornton,G.B., Parren,P.W., Sawyer,L.S., Hendry,R.M., Dunlop,N., Nara,P.L., and . (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266, 1024-1027.

Burton,D.R., Stanfield,R.L., and Wilson,I.A. (2005). Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 14943-14948.

Cagigi,A., Nilsson,A., De,M.A., and Chiodi,F. (2008). B cell immunopathology during HIV-1 infection: lessons to learn for HIV-1 vaccine design. *Vaccine* 26, 3016-3025.

Calarese,D.A., Scanlan,C.N., Zwick,M.B., Deechongkit,S., Mimura,Y., Kunert,R., Zhu,P., Wormald,M.R., Stanfield,R.L., Roux,K.H., Kelly,J.W., Rudd,P.M., Dwek,R.A., Katinger,H., Burton,D.R., and Wilson,I.A. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300, 2065-2071.

Candotti,D., Costagliola,D., Joberty,C., Bonduelle,O., Rouzioux,C., Autran,B., and Agut,H. (1999). Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT Study Group. *J. Med. Virol.* 58, 256-263.

Cao,Y., Qin,L., Zhang,L., Safrit,J., and Ho,D.D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 201-208.

Carbone,A., Manconi,R., Poletti,A., Tirelli,U., De,P.P., Santini,G., Diodato,S., Manconi,P.E., Grigoletto,E., Santi,L., and . (1985). Lymph node immunohistology in intravenous drug abusers with persistent generalized lymphadenopathy. *Arch. Pathol. Lab Med.* 109, 1007-1012.

Cardoso,R.M., Zwick,M.B., Stanfield,R.L., Kunert,R., Binley,J.M., Katinger,H., Burton,D.R., and Wilson,I.A. (2005). Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity.* 22, 163-173.

Chen,J., Powell,D., and Hu,W.S. (2006). High frequency of genetic recombination is a common feature of primate lentivirus replication. *J. Virol.* 80, 9651-9658.

Chohan,B., Lang,D., Sagar,M., Korber,B., Lavreys,L., Richardson,B., and Overbaugh,J. (2005). Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79, 6528-6531.

Coffin,J.M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* 42, 1-26.

Cohen Stuart,J.W., Wensing,A.M., Kovacs,C., Righart,M., de,J.D., Kaye,S., Schuurman,R., Visser,C.J., and Boucher,C.A. (2001). Transient relapses ("blips") of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 28, 105-113.

Coiras,M., Lopez-Huertas,M.R., Perez-Olmeda,M., and Alcamí,J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 798-812.

Conley,A.J., Gorny,M.K., Kessler,J.A., Boots,L.J., Ossorio-Castro,M., Koenig,S., Lineberger,D.W., Emini,E.A., Williams,C., and Zolla-Pazner,S. (1994). Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates by the broadly reactive anti-V3 monoclonal antibody, 447-52D. *J. Virol.* 68, 6994-7000.

Connor,R.I., Korber,B.T., Graham,B.S., Hahn,B.H., Ho,D.D., Walker,B.D., Neumann,A.U., Vermund,S.H., Mestecky,J., Jackson,S., Fenamore,E., Cao,Y., Gao,F., Kalams,S., Kunstman,K.J., McDonald,D., McWilliams,N., Trkola,A., Moore,J.P., and Wolinsky,S.M. (1998). Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J. Virol.* 72, 1552-1576.

Corti,D., Langedijk,J.P., Hinz,A., Seaman,M.S., Vanzetta,F., Fernandez-Rodriguez,B.M., Silacci,C., Pinna,D., Jarrossay,D., Balla-Jhagjhoorsingh,S., Willems,B., Zekveld,M.J., Dreja,H., O'Sullivan,E., Pade,C., Orkin,C., Jeffs,S.A., Montefiori,D.C., Davis,D., Weissenhorn,W., McKnight,A., Heeney,J.L., Sallusto,F., Sattentau,Q.J., Weiss,R.A., and Lanzavecchia,A. (2010). Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS. One.* 5, e8805.

Dayan,G.H., Thorley,M., Yamamura,Y., Rodriguez,N., McLaughlin,S., Torres,L.M., Seda,A., Carbia,M., Alexander,L.N., Caceres,V., and Pallansch,M.A. (2007). Serologic response to inactivated poliovirus vaccine: a randomized clinical trial comparing 2 vaccination schedules in Puerto Rico. *J. Infect. Dis.* 195, 12-20.

De,M.A., Nilsson,A., Titanji,K., Thorstensson,R., Reizenstein,E., Narita,M., Grutzmeier,S., Sonnerborg,A., and Chiodi,F. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* 103, 2180-2186.

Deeks,S.G., Schweighardt,B., Wrin,T., Galovich,J., Hoh,R., Sinclair,E., Hunt,P., McCune,J.M., Martin,J.N., Petropoulos,C.J., and Hecht,F.M. (2006). Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 80, 6155-6164.

Delgado,E., Thomson,M.M., Villahermosa,M.L., Sierra,M., Ocampo,A., Miralles,C., Rodriguez-Perez,R., Diz-Aren,J., Ojea-de,C.R., Losada,E., Cuevas,M.T., Vazquez-de,P.E., Carmona,R., Perez-Alvarez,L., Medrano,L., Cuevas,L., Taboada,J.A., and Najera,R. (2002). Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 29, 536-543.

Derdeyn,C.A., Decker,J.M., Sfakianos,J.N., Wu,X., O'Brien,W.A., Ratner,L., Kappes,J.C., Shaw,G.M., and Hunter,E. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* 74, 8358-8367.

Devash,Y., Calvelli,T.A., Wood,D.G., Reagan,K.J., and Rubinstein,A. (1990). Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high-affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3445-3449.

Domingo,E. and Holland,J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151-178.

Doria-Rose,N.A., Klein,R.M., Daniels,M.G., O'Dell,S., Nason,M., Lapedes,A., Bhattacharya,T., Migueles,S.A., Wyatt,R.T., Korber,B.T., Mascola,J.R., and Connors,M. (2010). Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* 84, 1631-1636.

Doria-Rose,N.A., Klein,R.M., Manion,M.M., O'Dell,S., Phogat,A., Chakrabarti,B., Hallahan,C.W., Migueles,S.A., Wrammert,J., Ahmed,R., Nason,M., Wyatt,R.T., Mascola,J.R., and Connors,M. (2009). Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J. Virol.* 83, 188-199.

Dornadula,G., Zhang,H., VanUitert,B., Stern,J., Livornese,L., Jr., Ingerman,M.J., Witek,J., Kedanis,R.J., Natkin,J., DeSimone,J., and Pomerantz,R.J. (1999). Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* 282, 1627-1632.

Dreyer,K., Kallas,E.G., Planelles,V., Montefiori,D., McDermott,M.P., Hasan,M.S., and Evans,T.G. (1999). Primary isolate neutralization by HIV type 1-infected patient sera in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 1563-1571.

Ehrlich,H.J., Muller,M., Oh,H.M., Tambyah,P.A., Joukhadar,C., Montomoli,E., Fisher,D., Berezuk,G., Fritsch,S., Low-Baselli,A., Vartian,N., Bobrovsky,R., Pavlova,B.G., Pollabauer,E.M., Kistner,O., and Barrett,P.N. (2008). A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N. Engl. J. Med.* 358, 2573-2584.

Emini,E.A., Nara,P.L., Schleif,W.A., Lewis,J.A., Davide,J.P., Lee,D.R., Kessler,J., Conley,S., Matsushita,S., Putney,S.D., and . (1990). Antibody-mediated in vitro neutralization of human immunodeficiency virus type 1 abolishes infectivity for chimpanzees. *J. Virol.* 64, 3674-3678.

Euler,Z., van Gils,M.J., Bunnik,E.M., Phung,P., Schweighardt,B., Wrin,T., and Schuitemaker,H. (2010). Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J. Infect. Dis.* 201, 1045-1053.

Fenyo,E.M., Heath,A., Dispinseri,S., Holmes,H., Lusso,P., Zolla-Pazner,S., Donners,H., Heyndrickx,L., Alcami,J., Bongertz,V., Jassoy,C., Malnati,M., Montefiori,D., Moog,C., Morris,L., Osmanov,S., Polonis,V., Sattentau,Q., Schuitemaker,H., Sutthent,R., Wrin,T., and Scarlatti,G. (2009). International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report. *PLoS. One.* 4, e4505.

Ferrari,G., Humphrey,W., McElrath,M.J., Excler,J.L., Duliege,A.M., Clements,M.L., Corey,L.C., Bolognesi,D.P., and Weinhold,K.J. (1997). Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1396-1401.

Fischl,M.A., Richman,D.D., Grieco,M.H., Gottlieb,M.S., Volberding,P.A., Laskin,O.L., Leedom,J.M., Groopman,J.E., Mildvan,D., Schooley,R.T., and . (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 317, 185-191.

Flynn,J.A., An,W., King,S.R., and Telesnitsky,A. (2004). Nonrandom dimerization of murine leukemia virus genomic RNAs. *J. Virol.* 78, 12129-12139.

Flynn,J.A. and Telesnitsky,A. (2006). Two distinct Moloney murine leukemia virus RNAs produced from a single locus dimerize at random. *Virology* 344, 391-400.

Fouts,T., Godfrey,K., Bobb,K., Montefiori,D., Hanson,C.V., Kalyanaraman,V.S., DeVico,A., and Pal,R. (2002). Crosslinked HIV-1 envelope-CD4 receptor complexes elicit broadly cross-reactive neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 11842-11847.

Frost,S.D., Liu,Y., Pond,S.L., Chappay,C., Wrin,T., Petropoulos,C.J., Little,S.J., and Richman,D.D. (2005). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B. *J. Virol.* 79, 6523-6527.

Fultz,P.N., Srinivasan,A., Greene,C.R., Butler,D., Swenson,R.B., and McClure,H.M. (1987). Superinfection of a chimpanzee with a second strain of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 61, 4026-4029.

Furtado,M.R., Callaway,D.S., Phair,J.P., Kunstman,K.J., Stanton,J.L., Macken,C.A., Perelson,A.S., and Wolinsky,S.M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* 340, 1614-1622.

Galli,G., Medini,D., Borgogni,E., Zedda,L., Bardelli,M., Malzone,C., Nuti,S., Tavarini,S., Sammiceli,C., Hilbert,A.K., Brauer,V., Banzhoff,A., Rappuoli,R., Del,G.G., and Castellino,F. (2009). Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 3877-3882.

Gao,F., Bailes,E., Robertson,D.L., Chen,Y., Rodenburg,C.M., Michael,S.F., Cummins,L.B., Arthur,L.O., Peeters,M., Shaw,G.M., Sharp,P.M., and Hahn,B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.

Gao,F., Robertson,D.L., Morrison,S.G., Hui,H., Craig,S., Decker,J., Fultz,P.N., Girard,M., Shaw,G.M., Hahn,B.H., and Sharp,P.M. (1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J. Virol.* 70, 7013-7029.

Garcia-Perez,J., Sanchez-Palomino,S., Perez-Olmeda,M., Fernandez,B., and Alcamí,J. (2007). A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.* 79, 127-137.

Goedert,J.J., Mendez,H., Drummond,J.E., Robert-Guroff,M., Minkoff,H.L., Holman,S., Stevens,R., Rubinstein,A., Blattner,W.A., Willoughby,A., and . (1989). Mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1: association with prematurity or low anti-gp120. *Lancet* 2, 1351-1354.

Gonzalez,N., Perez-Olmeda,M., Mateos,E., Cascajero,A., Alvarez,A., Spijkers,S., Garcia-Perez,J., Sanchez-Palomino,S., Ruiz-Mateos,E., Leal,M., and Alcamí,J. (2010). A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2493-2501.

Gorny,M.K., Conley,A.J., Karwowska,S., Buchbinder,A., Xu,J.Y., Emini,E.A., Koenig,S., and Zolla-Pazner,S. (1992). Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *J. Virol.* 66, 7538-7542.

Goulder,P.J., Bunce,M., Krausa,P., McIntyre,K., Crowley,S., Morgan,B., Edwards,A., Giangrande,P., Phillips,R.E., and McMichael,A.J. (1996). Novel, cross-



restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 1691-1698.

Grundner,C., Mirzabekov,T., Sodroski,J., and Wyatt,R. (2002). Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 76, 3511-3521.

Hahn,B.H., Shaw,G.M., Taylor,M.E., Redfield,R.R., Markham,P.D., Salahuddin,S.Z., Wong-Staal,F., Gallo,R.C., Parks,E.S., and Parks,W.P. (1986). Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 232, 1548-1553.

Harris,R.S., Bishop,K.N., Sheehy,A.M., Craig,H.M., Petersen-Mahrt,S.K., Watt,I.N., Neuberger,M.S., and Malim,M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113, 803-809.

Hartley,O., Klasse,P.J., Sattentau,Q.J., and Moore,J.P. (2005). V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 171-189.

Havlir,D.V., Bassett,R., Levitan,D., Gilbert,P., Tebas,P., Collier,A.C., Hirsch,M.S., Ignacio,C., Condra,J., Gunthard,H.F., Richman,D.D., and Wong,J.K. (2001). Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination hiv therapy. *JAMA* 286, 171-179.

Havlir,D.V., Strain,M.C., Clerici,M., Ignacio,C., Trabattoni,D., Ferrante,P., and Wong,J.K. (2003). Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *J. Virol.* 77, 11212-11219.

Hemelaar,J., Gouws,E., Ghys,P.D., and Osmanov,S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20, W13-W23.

Hermankova,M., Ray,S.C., Ruff,C., Powell-Davis,M., Ingersoll,R., D'Aquila,R.T., Quinn,T.C., Siliciano,J.D., Siliciano,R.F., and Persaud,D. (2001). HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA* 286, 196-207.

Hessell,A.J., Poignard,P., Hunter,M., Hangartner,L., Tehrani,D.M., Bleeker,W.K., Parren,P.W., Marx,P.A., and Burton,D.R. (2009). Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. Med.* 15, 951-954.

Hu,S.L., Fultz,P.N., McClure,H.M., Eichberg,J.W., Thomas,E.K., Zarling,J., Singhal,M.C., Kosowski,S.G., Swenson,R.B., Anderson,D.C., and . (1987). Effect of immunization with a vaccinia-HIV env recombinant on HIV infection of chimpanzees. *Nature* 328, 721-723.

Hu,W.S., Rhodes,T., Dang,Q., and Pathak,V. (2003). Retroviral recombination: review of genetic analyses. *Front Biosci.* 8, d143-d155.

Humbert,M., Antoni,S., Brill,B., Landersz,M., Rodes,B., Soriano,V., Wintergerst,U., Knechten,H., Staszewski,S., von,L.D., Dittmar,M.T., and Dietrich,U. (2007). Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur. J. Immunol.* 37, 501-515.

Hunt,P.W., Brenchley,J., Sinclair,E., McCune,J.M., Roland,M., Page-Shafer,K., Hsue,P., Emu,B., Krone,M., Lampiris,H., Douek,D., Martin,J.N., and Deeks,S.G. (2008). Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 126-133.

Jackson,G.G., Perkins,J.T., Rubenis,M., Paul,D.A., Knigge,M., Despotes,J.C., and Spencer,P. (1988). Passive immunoneutralization of human immunodeficiency virus in patients with advanced AIDS. *Lancet* 2, 647-652.

Jain,V. and Deeks,S.G. (2010). When to start antiretroviral therapy. *Curr. HIV. /AIDS Rep.* 7, 60-68.

Joos,B., Trkola,A., Fischer,M., Kuster,H., Rusert,P., Leemann,C., Boni,J., Oxenius,A., Price,D.A., Phillips,R.E., Wong,J.K., Hirschel,B., Weber,R., and Gunthard,H.F. (2005). Low human immunodeficiency virus envelope diversity correlates with low in vitro replication capacity and predicts spontaneous control of plasma viremia after treatment interruptions. *J. Virol.* 79, 9026-9037.

Kahn,J.O., Steimer,K.S., Baenziger,J., Duliege,A.M., Feinberg,M., Elbeik,T., Chesney,M., Murcar,N., Chernoff,D., and Sinangil,F. (1995). Clinical, immunologic, and virologic observations related to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in a volunteer in an HIV-1 vaccine clinical trial. *J. Infect. Dis.* 171, 1343-1347.

Kanki, P. J. Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2). *AIDS Rev.* 1[2], 101-108. 1999.

Ref Type: Online Source

Kaslow,R.A., Carrington,M., Apple,R., Park,L., Munoz,A., Saah,A.J., Goedert,J.J., Winkler,C., O'Brien,S.J., Rinaldo,C., Detels,R., Blattner,W., Phair,J., Erlich,H., and Mann,D.L. (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 2, 405-411.

Keefer,M.C., Wolff,M., Gorse,G.J., Graham,B.S., Corey,L., Clements-Mann,M.L., Verani-Ketter,N., Erb,S., Smith,C.M., Belshe,R.B., Wagner,L.J., McElrath,M.J., Schwartz,D.H., and Fast,P. (1997). Safety profile of phase I and II preventive HIV type 1 envelope vaccination: experience of the NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 1163-1177.

Kekow,J., Kern,P., Schmitz,H., and Gross,W.L. (1986). Abnormal B-cell response to T-cell-independent polyclonal B-cell activators in homosexuals presenting persistent generalized lymph node enlargement and HTLV-III antibodies. *Diagn. Immunol.* 4, 107-111.

Kessler,J.A., McKenna,P.M., Emini,E.A., Chan,C.P., Patel,M.D., Gupta,S.K., Mark,G.E., III, Barbas,C.F., III, Burton,D.R., and Conley,A.J. (1997). Recombinant human monoclonal antibody IgG1b12 neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 575-582.

Kharytonchyk,S.A., Kireyeva,A.I., Osipovich,A.B., and Fomin,I.K. (2005). Evidence for preferential copackaging of Moloney murine leukemia virus genomic RNAs transcribed in the same chromosomal site. *Retrovirology.* 2, 3.

Kieffer,T.L., Finucane,M.M., Nettles,R.E., Quinn,T.C., Broman,K.W., Ray,S.C., Persaud,D., and Siliciano,R.F. (2004). Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J. Infect. Dis.* 189, 1452-1465.

Kilby,J.M., Hopkins,S., Venetta,T.M., DiMassimo,B., Cloud,G.A., Lee,J.Y., Alldredge,L., Hunter,E., Lambert,D., Bolognesi,D., Matthews,T., Johnson,M.R., Nowak,M.A., Shaw,G.M., and Saag,M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* 4, 1302-1307.

Kimura,T., Yoshimura,K., Nishihara,K., Maeda,Y., Matsumi,S., Koito,A., and Matsushita,S. (2002). Reconstitution of spontaneous neutralizing antibody response against autologous human immunodeficiency virus during highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 185, 53-60.

Klein,M.R., van der Burg,S.H., Hovenkamp,E., Holwerda,A.M., Drijfhout,J.W., Melief,C.J., and Miedema,F. (1998). Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 9), 2191-2201.

Kloosterboer,N., Groeneveld,P.H., Jansen,C.A., van der Vorst,T.J., Koning,F., Winkel,C.N., Duits,A.J., Miedema,F., van,B.D., van Rij,R.P., Brinkman,K., and Schuitemaker,H. (2005). Natural controlled HIV infection: preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* 339, 70-80.

Kobayashi,M., Takaori-Kondo,A., Miyauchi,Y., Iwai,K., and Uchiyama,T. (2005). Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J. Biol. Chem.* 280, 18573-18578.

Kung,H.J., Bailey,J.M., Davidson,N., Vogt,P.K., Nicolson,M.O., and McAllister,R.M. (1975). Electron microscope studies of tumor virus RNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 39 Pt 2, 827-834.

Kung,H.J., Hu,S., Bender,W., Bailey,J.M., Davidson,N., Nicolson,M.O., and McAllister,R.M. (1976). RD-114, baboon, and woolly monkey viral RNA's compared in size and structure. *Cell* 7, 609-620.

Kwong,P.D. (2004). The 447-52D antibody: hitting HIV-1 where its armor is thickest. *Structure*. 12, 173-174.

Kwong,P.D., Doyle,M.L., Casper,D.J., Cicala,C., Leavitt,S.A., Majeed,S., Steenbeke,T.D., Venturi,M., Chaiken,I., Fung,M., Katinger,H., Parren,P.W., Robinson,J., Van,R.D., Wang,L., Burton,D.R., Freire,E., Wyatt,R., Sodroski,J., Hendrickson,W.A., and Arthos,J. (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.

Lafeuillade,A., Poggi,C., Tamalet,C., Profizi,N., Tourres,C., and Costes,O. (1997). Effects of a combination of zidovudine, didanosine, and lamivudine on primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 175, 1051-1055.

Lambotte,O., Boufassa,F., Madec,Y., Nguyen,A., Goujard,C., Meyer,L., Rouzioux,C., Venet,A., and Delfraissy,J.F. (2005). HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1053-1056.

Lambotte,O., Ferrari,G., Moog,C., Yates,N.L., Liao,H.X., Parks,R.J., Hicks,C.B., Owzar,K., Tomaras,G.D., Montefiori,D.C., Haynes,B.F., and Delfraissy,J.F. (2009). Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23, 897-906.

Lane,H.C., Masur,H., Edgar,L.C., Whalen,G., Rook,A.H., and Fauci,A.S. (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 309, 453-458.

Larder,B.A., Darby,G., and Richman,D.D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243, 1731-1734.

Larder,B.A. and Kemp,S.D. (1989). Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246, 1155-1158.

Learmont,J.C., Geczy,A.F., Mills,J., Ashton,L.J., Raynes-Greenow,C.H., Garsia,R.J., Dyer,W.B., McIntyre,L., Oelrichs,R.B., Rhodes,D.I., Deacon,N.J., and Sullivan,J.S. (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* 340, 1715-1722.

Lee,H.Y., Perelson,A.S., Park,S.C., and Leitner,T. (2008). Dynamic correlation between intrahost HIV-1 quasispecies evolution and disease progression. *PLoS. Comput. Biol.* 4, e1000240.

Li,T.S., Tubiana,R., Katlama,C., Calvez,V., Ait,M.H., and Autran,B. (1998). Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 351, 1682-1686.

Li,Y., Svehla,K., Louder,M.K., Wycuff,D., Phogat,S., Tang,M., Migueles,S.A., Wu,X., Phogat,A., Shaw,G.M., Connors,M., Hoxie,J., Mascola,J.R., and Wyatt,R. (2009). Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 83, 1045-1059.

Lima,V.D., Hogg,R.S., and Montaner,J.S. (2010). Expanding HAART treatment to all currently eligible individuals under the 2008 IAS-USA Guidelines in British Columbia, Canada. *PLoS. One.* 5, e10991.

Lum,J.J., Cohen,O.J., Nie,Z., Weaver,J.G., Gomez,T.S., Yao,X.J., Lynch,D., Pilon,A.A., Hawley,N., Kim,J.E., Chen,Z., Montpetit,M., Sanchez-Dardon,J., Cohen,E.A., and Badley,A.D. (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest* 111, 1547-1554.

Mahalanabis,M., Jayaraman,P., Miura,T., Pereyra,F., Chester,E.M., Richardson,B., Walker,B., and Haigwood,N.L. (2009). Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naive human immunodeficiency virus controllers. *J. Virol.* 83, 662-672.

Maldarelli,F., Palmer,S., King,M.S., Wiegand,A., Polis,M.A., Mican,J., Kovacs,J.A., Davey,R.T., Rock-Kress,D., Dewar,R., Liu,S., Metcalf,J.A., Rehm,C., Brun,S.C., Hanna,G.J., Kempf,D.J., Coffin,J.M., and Mellors,J.W. (2007). ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS. Pathog.* 3, e46.

Malim,M.H. (2009). APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 364, 675-687.

Mallon,P.W., Ray,J., and Cooper,D.A. (2003). Effect of therapeutic drug monitoring on outcome in antiretroviral experienced HIV-infected individuals. *J. Clin. Virol.* 26, 223-227.

Mangeat,B., Turelli,P., Caron,G., Friedli,M., Perrin,L., and Trono,D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.

Mansky,L.M. and Temin,H.M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087-5094.

Markowitz,M., Vesanen,M., Tenner-Racz,K., Cao,Y., Binley,J.M., Talal,A., Hurley,A., Jin,X., Chaudhry,M.R., Yaman,M., Frankel,S., Heath-Chiozzi,M., Leonard,J.M., Moore,J.P., Racz,P., Nixon,D.F., and Ho,D.D. (1999). The effect of

commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J. Infect. Dis.* 179, 527-537.

Marzolini,C., Telenti,A., Decosterd,L.A., Greub,G., Biollaz,J., and Buclin,T. (2001). Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 15, 71-75.

Mascola, J. R. Defining the protective antibody response for HIV-1. *Curr.Mol.Med.* 3[3], 209-216. 2003.  
Ref Type: Online Source

Mascola, J. R. and Montefiori, D. C. HIV-1: nature's master of disguise. *Nat.Med.* 9[4], 393-394. 2003.

Matthews,T.J., Langlois,A.J., Robey,W.G., Chang,N.T., Gallo,R.C., Fischinger,P.J., and Bolognesi,D.P. (1987). Restricted neutralization of divergent HTLV-III/LAV isolates by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Haematol. Blood Transfus.* 31, 414-422.

McElrath,M.J., Corey,L., Greenberg,P.D., Matthews,T.J., Montefiori,D.C., Rowen,L., Hood,L., and Mullins,J.I. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 infection despite prior immunization with a recombinant envelope vaccine regimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3972-3977.

McMichael,A.J. and Phillips,R.E. (1997). Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 271-296.

Migueles,S.A., Laborico,A.C., Shupert,W.L., Sabbaghian,M.S., Rabin,R., Hallahan,C.W., van,B.D., Kostense,S., Miedema,F., McLaughlin,M., Ehler,L., Metcalf,J., Liu,S., and Connors,M. (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* 3, 1061-1068.

Migueles,S.A., Sabbaghian,M.S., Shupert,W.L., Bettinotti,M.P., Marincola,F.M., Martino,L., Hallahan,C.W., Selig,S.M., Schwartz,D., Sullivan,J., and Connors,M. (2000). HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2709-2714.

Mikell,I., Sather,D.N., Kalams,S.A., Altfeld,M., Alter,G., and Stamatatos,L. (2011). Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. *PLoS. Pathog.* 7, e1001251.

Moir,S. and Fauci,A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 235-245.

Morris,L., Binley,J.M., Clas,B.A., Bonhoeffer,S., Astill,T.P., Kost,R., Hurley,A., Cao,Y., Markowitz,M., Ho,D.D., and Moore,J.P. (1998). HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 188, 233-245.

Muster,T., Steindl,F., Purtscher,M., Trkola,A., Klima,A., Himmler,G., Rucker,F., and Katinger,H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6642-6647.

Nair,N., Gans,H., Lew-Yasukawa,L., Long-Wagar,A.C., Arvin,A., and Griffin,D.E. (2007). Age-dependent differences in IgG isotype and avidity induced by measles vaccine received during the first year of life. *J. Infect. Dis.* 196, 1339-1345.

Nara,P.L., Robey,W.G., Pyle,S.W., Hatch,W.C., Dunlop,N.M., Bess,J.W., Jr., Kelliher,J.C., Arthur,L.O., and Fischinger,P.J. (1988). Purified envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 variants induce individual, type-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 62, 2622-2628.

Nettles,R.E., Kieffer,T.L., Kwon,P., Monie,D., Han,Y., Parsons,T., Cofrancesco,J., Jr., Gallant,J.E., Quinn,T.C., Jackson,B., Flexner,C., Carson,K., Ray,S., Persaud,D., and Siliciano,R.F. (2005). Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 293, 817-829.

Ofek,G., Tang,M., Sambor,A., Katinger,H., Mascola,J.R., Wyatt,R., and Kwong,P.D. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* 78, 10724-10737.

Onafuwa-Nuga,A. and Telesnitsky,A. (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 451-80, Table.

Ortiz,G.M., Nixon,D.F., Trkola,A., Binley,J., Jin,X., Bonhoeffer,S., Kuebler,P.J., Donahoe,S.M., Demoitie,M.A., Kakimoto,W.M., Ketas,T., Clas,B., Heymann,J.J., Zhang,L., Cao,Y., Hurley,A., Moore,J.P., Ho,D.D., and Markowitz,M. (1999). HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest* 104, R13-R18.

Overton,E.T., Sungkanuparph,S., Powderly,W.G., Seyfried,W., Groger,R.K., and Aberg,J.A. (2005). Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1045-1048.

Pai, E. F., Klein, M. H., Chong, P., and Pedyczak, A. World Intellectual Property Organization patent WO-00/61618. 2000.

Palker,T.J., Clark,M.E., Langlois,A.J., Matthews,T.J., Weinhold,K.J., Randall,R.R., Bolognesi,D.P., and Haynes,B.F. (1988). Type-specific neutralization of

the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 1932-1936.

Palmer,S., Maldarelli,F., Wiegand,A., Bernstein,B., Hanna,G.J., Brun,S.C., Kempf,D.J., Mellors,J.W., Coffin,J.M., and King,M.S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3879-3884.

Pancera,M., McLellan,J.S., Wu,X., Zhu,J., Changela,A., Schmidt,S.D., Yang,Y., Zhou,T., Phogat,S., Mascola,J.R., and Kwong,P.D. (2010). Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J. Virol.* 84, 8098-8110.

Pantophlet,R., Wilson,I.A., and Burton,D.R. (2003). Hyperglycosylated mutants of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 monomeric gp120 as novel antigens for HIV vaccine design. *J. Virol.* 77, 5889-5901.

Perelson,A.S., Essunger,P., Cao,Y., Vesanen,M., Hurley,A., Saksela,K., Markowitz,M., and Ho,D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387, 188-191.

Perelson,A.S., Neumann,A.U., Markowitz,M., Leonard,J.M., and Ho,D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582-1586.

Pereyra,F., Addo,M.M., Kaufmann,D.E., Liu,Y., Miura,T., Rathod,A., Baker,B., Trocha,A., Rosenberg,R., Mackey,E., Ueda,P., Lu,Z., Cohen,D., Wrinn,T., Petropoulos,C.J., Rosenberg,E.S., and Walker,B.D. (2008). Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 563-571.

Persaud,D., Siberry,G.K., Ahonkhai,A., Kajdas,J., Monie,D., Hutton,N., Watson,D.C., Quinn,T.C., Ray,S.C., and Siliciano,R.F. (2004). Continued production of drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 in children on combination antiretroviral therapy who have undetectable viral loads. *J. Virol.* 78, 968-979.

Piantadosi,A., Panteleeff,D., Blish,C.A., Baeten,J.M., Jaoko,W., McClelland,R.S., and Overbaugh,J. (2009). Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. *J. Virol.* 83, 10269-10274.

Plantier,J.C., Gueudin,M., De,O.F., Damond,F., Lemee,V., Brun-Vezinet,F., and Simon,F. (2004). Rapid discrimination between human immunodeficiency virus type 2 groups A and B by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5866-5870.

Plantier,J.C., Leoz,M., Dickerson,J.E., De,O.F., Cordonnier,F., Lemee,V., Damond,F., Robertson,D.L., and Simon,F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871-872.



Platt,E.J., Wehrly,K., Kuhmann,S.E., Chesebro,B., and Kabat,D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 2855-2864.

Popovic,M., Sarngadharan,M.G., Read,E., and Gallo,R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224, 497-500.

Preston,B.D., Poiesz,B.J., and Loeb,L.A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242, 1168-1171.

Putkonen,P., Thorstensson,R., Ghavamzadeh,L., Albert,J., Hild,K., Biberfeld,G., and Norrby,E. (1991). Prevention of HIV-2 and SIVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature* 352, 436-438.

Rerks-Ngarm,S., Pitisuttithum,P., Nitayaphan,S., Kaewkungwal,J., Chiu,J., Paris,R., Premisri,N., Namwat,C., de,S.M., Adams,E., Benenson,M., Gurunathan,S., Tartaglia,J., McNeil,J.G., Francis,D.P., Stablein,D., Birx,D.L., Chunsuttiwat,S., Khamboonruang,C., Thongcharoen,P., Robb,M.L., Michael,N.L., Kunasol,P., and Kim,J.H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361, 2209-2220.

Rhodes,T., Wargo,H., and Hu,W.S. (2003). High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J. Virol.* 77, 11193-11200.

Ricchetti,M. and Buc,H. (1990). Reverse transcriptases and genomic variability: the accuracy of DNA replication is enzyme specific and sequence dependent. *EMBO J.* 9, 1583-1593.

Rivera-Morales,L.G., Luna-Cruz,I.E., Ramos-Alfano,G., Rosas-Taraco,A.G., Ramos-Jimenez,J., Palacios-Saucedo,G.C., Vazquez-Guillen,J.M., Franco-Molina,M.A., Tamez-Guerra,R., and Rodriguez-Padilla,C. (2011). [First case of HIV-1 subtype C infection in Mexico]. *Gac. Med. Mex.* 147, 424-428.

Rivera-Morales,L.G., Novitsky,V.A., Trujillo,J.R., Lavallo-Montalvo,C., Cano-Dominguez,C., Ramos-Jimenez,J., Jimenez-Rios,E., Flores-Flores,L., Lopez-Guillen,P., Gilbert,P., Vannberg,F., Tamez-Guerra,R., Rodriguez-Padilla,C., and Essex,M. (2001). The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 87-92.

Roberts,J.D., Bebenek,K., and Kunkel,T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171-1173.

Robertson,D.L., Anderson,J.P., Bradac,J.A., Carr,J.K., Foley,B., Funkhouser,R.K., Gao,F., Hahn,B.H., Kalish,M.L., Kuiken,C., Learn,G.H., Leitner,T., McCutchan,F., Osmanov,S., Peeters,M., Pieniazek,D., Salminen,M., Sharp,P.M., Wolinsky,S., and Korber,B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288, 55-56.

Robey,W.G., Arthur,L.O., Matthews,T.J., Langlois,A., Copeland,T.D., Lerche,N.W., Oroszlan,S., Bolognesi,D.P., Gilden,R.V., and Fischinger,P.J. (1986). Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 7023-7027.

Rooke,R., Tremblay,M., Soudeyns,H., DeStephano,L., Yao,X.J., Fanning,M., Montaner,J.S., O'Shaughnessy,M., Gelmon,K., Tsoukas,C., and . (1989). Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy. Canadian Zidovudine Multi-Centre Study Group. *AIDS* 3, 411-415.

Rosenberg,E.S., Billingsley,J.M., Caliendo,A.M., Boswell,S.L., Sax,P.E., Kalams,S.A., and Walker,B.D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278, 1447-1450.

Rossi,P., Moschese,V., Broliden,P.A., Fundaro,C., Quinti,I., Plebani,A., Giaquinto,C., Tovo,P.A., Ljunggren,K., Rosen,J., and . (1989). Presence of maternal antibodies to human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp120 epitopes correlates with the uninfected status of children born to seropositive mothers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 8055-8058.

Sajadi,M.M., Constantine,N.T., Mann,D.L., Charurat,M., Dadzan,E., Kadlecik,P., and Redfield,R.R. (2009). Epidemiologic characteristics and natural history of HIV-1 natural viral suppressors. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 50, 403-408.

Sanders,R.W., Vesanen,M., Schuelke,N., Master,A., Schiffner,L., Kalyanaraman,R., Paluch,M., Berkhout,B., Maddon,P.J., Olson,W.C., Lu,M., and Moore,J.P. (2002). Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76, 8875-8889.

Santibanez,S., Niewiesk,S., Heider,A., Schneider-Schaulies,J., Berbers,G.A., Zimmermann,A., Halenius,A., Wolbert,A., Deitemeier,I., Tischer,A., and Hengel,H. (2005). Probing neutralizing-antibody responses against emerging measles viruses (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? *J. Gen. Virol.* 86, 365-374.

Saphire,E.O., Parren,P.W., Pantophlet,R., Zwick,M.B., Morris,G.M., Rudd,P.M., Dwek,R.A., Stanfield,R.L., Burton,D.R., and Wilson,I.A. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293, 1155-1159.

Sarmati,L., Nicastri,E., El-Sawaf,G., Ventura,L., Salanitro,A., Ercoli,L., Vella,S., and Andreoni,M. (1997). Increase in neutralizing antibody titer against sequential autologous HIV-1 isolates after 16 weeks saquinavir (Invirase) treatment. *J. Med. Virol.* 53, 313-318.

Sather,D.N., Armann,J., Ching,L.K., Mavrantoni,A., Sellhorn,G., Caldwell,Z., Yu,X., Wood,B., Self,S., Kalams,S., and Stamatatos,L. (2009). Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 83, 757-769.

Scheid,J.F., Mouquet,H., Feldhahn,N., Seaman,M.S., Velinzon,K., Pietzsch,J., Ott,R.G., Anthony,R.M., Zebroski,H., Hurley,A., Phogat,A., Chakrabarti,B., Li,Y., Connors,M., Pereyra,F., Walker,B.D., Wardemann,H., Ho,D., Wyatt,R.T., Mascola,J.R., Ravetch,J.V., and Nussenzweig,M.C. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636-640.

Schmidtayerova,H., Lackovicova,M., Stankova,M., Bruckova,M., Surovy,I., Ujhelyi,E., Fust,G., and Mayer,V. (1992). Virus neutralizing antibodies at different stages of the HIV disease: increased levels after azidothymidine treatment. *Acta Virol.* 36, 157-165.

Shankarappa,R., Margolick,J.B., Gange,S.J., Rodrigo,A.G., Upchurch,D., Farzadegan,H., Gupta,P., Rinaldo,C.R., Learn,G.H., He,X., Huang,X.L., and Mullins,J.I. (1999). Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 73, 10489-10502.

Shaw,G.M., Hahn,B.H., Arya,S.K., Groopman,J.E., Gallo,R.C., and Wong-Staal,F. (1984). Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 226, 1165-1171.

Simek,M.D., Rida,W., Priddy,F.H., Pung,P., Carrow,E., Laufer,D.S., Lehrman,J.K., Boaz,M., Tarragona-Fiol,T., Miro,G., Birungi,J., Pozniak,A., McPhee,D.A., Manigart,O., Karita,E., Inwoley,A., Jaoko,W., Dehovitz,J., Bekker,L.G., Pitisuttithum,P., Paris,R., Walker,L.M., Poignard,P., Wrin,T., Fast,P.E., Burton,D.R., and Koff,W.C. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* 83, 7337-7348.

Stanfield,R.L., Gorny,M.K., Williams,C., Zolla-Pazner,S., and Wilson,I.A. (2004). Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure.* 12, 193-204.

Sterne,J.A., May,M., Costagliola,D., de,W.F., Phillips,A.N., Harris,R., Funk,M.J., Gekus,R.B., Gill,J., Dabis,F., Miro,J.M., Justice,A.C., Ledergerber,B., Fatkenheuer,G., Hogg,R.S., Monforte,A.D., Saag,M., Smith,C., Staszewski,S., Egger,M., and Cole,S.R. (2009). Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet* 373, 1352-1363.

Takeuchi,Y., McClure,M.O., and Pizzato,M. (2008). Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 82, 12585-12588.

Taylor,B.S., Sobieszczyk,M.E., McCutchan,F.E., and Hammer,S.M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 358, 1590-1602.

Temin,H.M. (1993). Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6900-6903.

Titanji,K., De,M.A., Cagigi,A., Thorstensson,R., Grutzmeier,S., Atlas,A., Hejdeman,B., Kroon,F.P., Lopalco,L., Nilsson,A., and Chiodi,F. (2006). Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* 108, 1580-1587.

Tobin,N.H., Learn,G.H., Holte,S.E., Wang,Y., Melvin,A.J., McKernan,J.L., Pawluk,D.M., Mohan,K.M., Lewis,P.F., Mullins,J.I., and Frenkel,L.M. (2005). Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J. Virol.* 79, 9625-9634.

Treanor,J.J., Campbell,J.D., Zangwill,K.M., Rowe,T., and Wolff,M. (2006). Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N. Engl. J. Med.* 354, 1343-1351.

Trkola,A., Pomales,A.B., Yuan,H., Korber,B., Maddon,P.J., Allaway,G.P., Katinger,H., Barbas,C.F., III, Burton,D.R., Ho,D.D., and . (1995). Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* 69, 6609-6617.

Trkola,A., Purtscher,M., Muster,T., Ballaun,C., Buchacher,A., Sullivan,N., Srinivasan,K., Sodroski,J., Moore,J.P., and Katinger,H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1100-1108.

Valtanen,S., Roivainen,M., Piirainen,L., Stenvik,M., and Hovi,T. (2000). Poliovirus-specific intestinal antibody responses coincide with decline of poliovirus excretion. *J. Infect. Dis.* 182, 1-5.

Wain-Hobson, S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 182[3], 878-883. 1991.

Ref Type: Online Source

Wainberg,M.A., Drosopoulos,W.C., Salomon,H., Hsu,M., Borkow,G., Parniak,M., Gu,Z., Song,Q., Manne,J., Islam,S., Castriota,G., and Prasad,V.R. (1996). Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 271, 1282-1285.

Wang,B., Mikhail,M., Dyer,W.B., Zaunders,J.J., Kelleher,A.D., and Saksena,N.K. (2003). First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* 312, 135-150.

Wang,Q., Shang,H., Han,X., Zhang,Z., Jiang,Y., Wang,Y., Dai,D., and Diao,Y. (2008). High level serum neutralizing antibody against HIV-1 in Chinese long-term non-progressors. *Microbiol. Immunol.* 52, 209-215.

Wong-Staal,F., Shaw,G.M., Hahn,B.H., Salahuddin,S.Z., Popovic,M., Markham,P., Redfield,R., and Gallo,R.C. (1985). Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229, 759-762.

Wyatt,R. and Sodroski,J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280, 1884-1888.

Yang,X., Wyatt,R., and Sodroski,J. (2001). Improved elicitation of neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency viruses by soluble stabilized envelope glycoprotein trimers. *J. Virol.* 75, 1165-1171.

Yarchoan,R., Berg,G., Brouwers,P., Fischl,M.A., Spitzer,A.R., Wichman,A., Grafman,J., Thomas,R.V., Safai,B., Brunetti,A., and . (1987). Response of human-immunodeficiency-virus-associated neurological disease to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Lancet* 1, 132-135.

Yarchoan,R. and Broder,S. (1987). Progress in the development of antiviral therapy for HTLV-III-associated diseases. *Important Adv. Oncol.* 293-311.

Zhuang,J., Mukherjee,S., Ron,Y., and Dougherty,J.P. (2006). High rate of genetic recombination in murine leukemia virus: implications for influencing proviral ploidy. *J. Virol.* 80, 6706-6711.

Zolla-Pazner,S., Zhong,P., Revesz,K., Volsky,B., Williams,C., Nyambi,P., and Gorny,M.K. (2004). The cross-clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 1254-1258.

Zwick,M.B., Labrijn,A.F., Wang,M., Spenlehauer,C., Saphire,E.O., Binley,J.M., Moore,J.P., Stiegler,G., Katinger,H., Burton,D.R., and Parren,P.W. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75, 10892-10905.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

José Maximiliano Medina Ramírez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: BÚSQUEDA DE RESPUESTA HUMORAL NEUTRALIZANTE EN PACIENTES VIH-1<sup>+</sup> CON NIVELES INDETECTABLES DE VIREMIA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Guaymas, Sonora el 24 de Septiembre de 1978, hijo de Maximiliano Medina y Guadalupe Ramírez

Educación: Egresado del Instituto Tecnológico de Sonora, grado obtenido Ingeniero Biotecnólogo en 2003.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología.

Experiencia Profesional: Ingeniero del departamento de calidad de la empresa Bebidas Purificadas S.A. de C.V. en 2003.

## Broadly Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Patients with Undetectable Viremia<sup>▽</sup>

M. Medina-Ramírez,<sup>1,2,5</sup> V. Sánchez-Merino,<sup>1,2</sup> S. Sánchez-Palomino,<sup>1,2</sup> A. Merino-Mansilla,<sup>1,2</sup>  
C. B. Ferreira,<sup>1,2</sup> I. Pérez,<sup>1,3</sup> N. González,<sup>4</sup> A. Alvarez,<sup>4</sup> J. M. Alcocer-González,<sup>5</sup>  
F. García,<sup>2,3</sup> J. M. Gatell,<sup>2,3</sup> J. Alcamí,<sup>4</sup> and E. Yuste<sup>1,2\*</sup>

*Retrovirology and Viral Immunopathology Laboratory, IDIBAPS, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>1</sup>; HIVACAT, Hospital Clínic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>2</sup>; Infectious Diseases Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>3</sup>; AIDS Immunopathology Unit, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain<sup>4</sup>; and Institute of Immunology and Virology, Autonomous University of Nuevo Leon, Monterrey, Mexico<sup>5</sup>*

Received 29 November 2010/Accepted 28 March 2011

**Several recent studies have identified HIV-infected patients able to produce a broad neutralizing response, and the detailed analyses of their sera have provided valuable information to improve future vaccine design. All these studies have excluded patients on antiretroviral treatment and with undetectable viral loads, who have an improved B cell profile compared to untreated patients. To better understand the induction of neutralizing antibodies in patients on antiretroviral treatment with undetectable viremia, we have screened 508 serum samples from 364 patients (173 treated and 191 untreated) for a broadly neutralizing antibody (bNAb) response using a new strategy based on the use of recombinant viruses. Sera able to neutralize a minipanel of 6 recombinant viruses, including envelopes from 5 different subtypes, were found in both groups. After IgG purification, we were able to confirm the presence of IgG-associated broadly neutralizing activity in 3.7% (7 of 191) of untreated patients with detectable viremia and 1.7% (3 of 174) of aviremic patients receiving antiretroviral treatment. We thus confirm the possibility of induction of a broad IgG-associated neutralizing response in patients on antiretroviral treatment, despite having undetectable viremia. This observation is in stark contrast to the data obtained from long-term nonprogressors, whose little neutralizing activity has been attributed to the low levels of viral replication.**

Induction of antibodies that neutralize a broad range of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates is a major goal in vaccine development. To date, the antibodies elicited by vaccines have had weak activity against a limited spectrum of HIV-1 strains (34, 55, 88). However, many HIV-infected patients produce neutralizing antibodies (NAbs), and a small fraction make extremely potent NAbs with broad cross-reactivity (5, 6, 24, 62, 78, 80). Understanding how a broadly reactive NAb response develops in some HIV-1-infected patients may provide important clues for vaccine design. The clinical parameters associated with broadly reactive NAbs in serum have been the subject of much recent interest (23, 35, 73, 78). A recent comparison of neutralization breadth with clinical and demographic variables in a large cohort of untreated patients has revealed an association between viral load (VL) and neutralization breadth (23). This observation suggests that high levels of viremia increase the exposure to the antigen and may be beneficial for the development of broad NAbs. This correlation has also been observed in some studies with different patient cohorts (73, 78). Consistent with these reports, several laboratories have shown that sera from long-term nonprogressors (LTNPs) with <50 copies of HIV RNA/ml plasma had little neutralizing activity. Compared to

patients with higher levels of viremia, LTNPs made weak NAb responses that had been attributed to a reduced antigenic stimulation of B cells (3, 23, 23, 24, 46, 50, 71).

Little is known about the neutralizing activity induced in patients on antiretroviral treatment (ART) with undetectable viral loads. ART patients constitute an interesting group of individuals with improved B cell function compared to untreated individuals who have higher levels of viremia. The changes in the frequency of B cell subpopulations after the administration of ART have already been characterized. Modifications in B cell counts after 12 months of ART have been detected in a group of individuals with chronic HIV infection (59). In these patients, ART leads to a significant increase in B cell numbers and to a normalization of B cell subpopulations, providing a possible explanation for improved B cell responses to both T cell-independent and T cell-dependent immunogens after ART (29, 44, 66). Remarkably, there is little information about the humoral immune response against HIV in ART patients. In these patients, most B cell defects associated with HIV infection can be reversed by ART; however, it is generally believed that the humoral immune response against HIV does not improve due to the reduced antigenic stimulation. To date there is no evidence supporting the induction of an NAb response against HIV in ART patients. Several groups have recently screened sera from cohorts of infected individuals to analyze the neutralizing activity of large groups of patients. However, all the studies had similar sample selection criteria and always excluded patients on antiretroviral treatment (24, 28, 80).

\* Corresponding author. Mailing address: Retrovirology and Viral Immunopathology Laboratory, IDIBAPS, Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona, Spain. Phone: 34 932 275430. Fax: 34 934 514438. E-mail: eyuste@clinic.ub.es.

<sup>▽</sup> Published ahead of print on 6 April 2011.

TABLE 1. Clinical characteristics of the patient groups

Characteristic	Total	ART patients	Untreated patients
Total no. (%) of patients	364	173 (47.5)	191 (52.5) <sup>a</sup>
No. (%) of patients by gender			
Male	299 (82.1)	145 (83.8)	154 (80.6)
Female	65 (17.9)	28 (16.2)	37 (19.4)
No. (%) of patients on:			
ART containing EFV	73 (42.2)	73 (42.2)	0 (0)
ART containing no EFV	100 (57.8)	100 (57.8)	0 (0)
No. (%) of patients by risk group			
Injecting drug user	27 (7.4)	15 (8.7)	12 (6.3)
Injecting drug user + homosexual	8 (2.2)	6 (3.5)	2 (1.0)
Bisexual	4 (1.1)	2 (1.2)	2 (1.0)
Heterosexual contact	90 (24.7)	44 (25.4)	46 (24.1)
Hemophiliac	2 (0.5)	1 (0.6)	1 (0.5)
Homosexual	213 (58.5)	96 (55.5)	117 (61.3)
Transfusion	2 (0.5)	2 (1.2)	0 (0.0)
Unknown	18 (4.9)	7 (40.5)	11 (5.8)
Median (range) age (yr)	42 (24–78)	41.5 (24–78)	40 (24–68)
Median (range) no. of viral RNA copies/ml plasma <sup>b</sup>	<50 (<50–222,117)	<50 (<50–85,454)	10,241 (<50–222,117)
No. of CD4 <sup>+</sup> T cells/ $\mu$ l (median/range)	663 (80–2,154)	689 (80–1,916)	567 (184–2,154)
Median (range) no. of yr since diagnosis <sup>c</sup>	9 (0–24)	9 (1–24)	5 (0–24)
Median (range) no. of yr on ART	6 (0.1–17)	5 (0.1–13)	0 <sup>a</sup> (0–16)

<sup>a</sup> Thirty-three of the untreated patients had a history of treatment, and all of them had been off ARVs for at least 3 years. For these patients, the median number of years on ART is 8 and the range is 3 to 16.

<sup>b</sup> The limit of detection was 50 copies/ml. Viremia was undetectable in 167 ART patients and 6 untreated patients.

<sup>c</sup> The date of diagnosis was known in 166 ART patients and 186 untreated patients.

In the present study, we evaluated NAb breadth in a set of 508 serum samples from 364 HIV-1-infected individuals, including 173 patients on antiretroviral treatment. We found a significant broad IgG-associated neutralizing response in ART patients with undetectable viremia. We hypothesize that, in these patients, the lack of antigenic stimulation could have been compensated for by an improved B cell function as a result of the undetectable viremia in response to antiretroviral treatment.

#### MATERIALS AND METHODS

**Study participants and demographics.** In order to better understand the spectrum and breadth of neutralization against HIV-1 in ART patients, we evaluated sera from a large cohort of HIV-infected patients. A total of 508 samples were collected from 364 HIV-infected individuals treated in Hospital Clínic (Barcelona, Spain). Patients in the present study signed informed consent. Overall, 82.1% of participants were male and 17.9% were female. Heterosexual transmission was reported for 24.7% of the patients, while men who have sex with men accounted for 58.5% of the study population. Intravenous drug use accounted for 7.4% of patients, and other constituted 4.5% of the study population and included transmission via blood transfusion or unknown transmission route as self-reported. Data for transmission were not available for 4.9% of samples. All the patients were presumed to be infected with clade B virus on the basis of the locations of residency. Table 1 shows the demographic characteristics of the patients: the median and range for each patient group for CD4<sup>+</sup> T cell count, viral load, number of years since HIV diagnosis at the time of screening, characteristics of ART, and number of years on ART. One hundred seventy-three patients were on ART and had undetectable viremia (<50 copies/ml of plasma) and a median CD4<sup>+</sup> T cell count of 689 cells/ $\mu$ l. One hundred ninety-one patients were untreated at the time of sampling and had a median number of viral RNA copies/ml in plasma of 10,241 and a median CD4<sup>+</sup> T cell count of 567 cells/ $\mu$ l. The median numbers of years since diagnosis were 9 for ART patients and 5 for untreated patients. The median numbers of years on ART were 5 for ART patients and 0 for untreated patients (Table 1).

**Generation of a minipanel of recombinant viruses.** Full-length infectious molecular clones were constructed by replacing the *env* sequence of HIV<sub>NL4-3</sub> with *env* sequences from divergent primary isolates to generate a minipanel of recombinant viruses (RVs). The virus strains for the minipanel were selected by the V3C3 (spanning amino acids [aa] 300 to 392 of the gp120 glycoprotein, according to HxB2 numbering) diversity among the *env* genes, as follows: nucleotide sequences from reference strains were downloaded from the Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>), and all positions with alignment gaps in at least one sequence were excluded from further analysis; the number of different bases in the pairwise comparisons and phylogenetic analysis was determined by MEGA software; DNA distance matrices were calculated by the Kimura two-parameter method; and a phylogenetic tree was constructed with distance matrices using the neighbor-joining method; finally, the robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis of 1,000 replicas. The selected strains provided by H. Holmes (NIBSC, United Kingdom) through the NeutNet consortium (G. Scarlatti) (28) were the following (clades are given in parentheses): V1191 (A), 92BR025 (C), 92UG024 (D), CM244 (E), and AC10 (B). RVs were obtained by removing the *Renilla* luciferase gene and restoring the *nef* gene in a group of *Renilla* recombinant viruses (30). NL4-3 strain (clade B) was included in the minipanel as a neutralization-sensitive control. An amphotropic vesicular stomatitis virus (VSV) Env pseudotyped on an HIV-1 core was added to the panel as a specificity control virus in IgG neutralization testing. DNA sequence analysis was performed to verify the constructions.

Virus stocks were produced by transfecting the DNA constructions in HEK293T cells using the calcium phosphate method according to the manufacturer's recommended protocol (ProFection mammalian transfection system; Promega, Madison, WI). Virus was quantified by determining the concentration of p24 capsid in the supernatant by an antigen capture assay (Innogenetics, Belgium). VSV pseudotyped virus stocks were produced by cotransfecting HEK293T cells with two plasmids: pNL4-3 $\Delta$ envFL (65) and a second plasmid, pVSV-G, that expresses the VSV glycoprotein, using the calcium phosphate method mentioned above.

RVs carrying a *Renilla* luciferase gene in the position of *nef* were generated by cloning the full-length envelope from HIV-infected patients in the pNL-lacZ/Env-Ren vector as described previously (33). The envelopes of viral strains NP1525 (E), SF162 (B) QH0692 (B), and MN (B) were amplified from culture supernatants kindly provided by H. Holmes (NIBSC, United Kingdom) through



the NeutNet consortium (G. Scarlatti) (28). Envelopes from strains P-1261 (CRF02\_AG), 1608-8 (A1), X-845-4 (F1), X-1628-2 (G), X-2118-2 (C), 138.7 (CRF14BG), and 2105 (CRF14BG) from culture supernatants were kindly provided by Lucía Pérez Álvarez, Instituto de Salud Carlos III, Spain. The clade B envelopes of strains 7191, 8439, 37343, 39775, 11525, 14382, 16218, and 22652 were amplified from plasma samples from patients with early infection (kind gift of Jose Maria Miró, Hospital Clinic de Barcelona) and envelopes of strains 1.22, 2.15, 3.18 3.25, and 2.9 from HIV-infected patients with an advanced stage of the disease followed in our department. The BX08 envelope was obtained from a patient with primary infection and has been previously described (61). The resulting constructs were transfected into HEK293T cells to generate chimeric recombinant viruses.

**Infectivity assay.** Viral infectivity was measured using TZM-bl indicator cells (expressing CD4 receptor and CCR5/CXCR4 coreceptors with an integrated long terminal repeat-Luc reporter system) (22, 74, 82, 89). Briefly, a 96-well plate was set up, in triplicate, with three sets of 2-fold dilutions of the virus (40 ng to 0.156 ng) and three uninfected controls. To these wells,  $10^4$  TZM-bl cells were added, and the plate was transferred to a humidified CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. After 72 h of incubation at 37°C, supernatants were removed and the cell-associated luciferase activity for each well was determined on a microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA) by using a luciferase assay kit (Biotherma, Sweden).

**Neutralization.** Randomly selected serum samples were tested with the six recombinant viruses from the minipanel using a luciferase reporter cell assay. To perform neutralization assays, 96-well plates were set up as follows: to the first three columns, 25  $\mu$ l of medium (Dulbecco modified Eagle medium [DMEM], 10% fetal bovine serum [FBS]) was added; to each of the other columns (columns 4 through 12), 25- $\mu$ l aliquots of the corresponding serum dilution (1/200 or 1/2,000) in DMEM-10% FBS were added. All serum samples were heat inactivated at 56°C for 30 min before use in neutralization assays. Each virus in a total volume of 75  $\mu$ l was then added to each well in columns 3 through 12. Virus-free medium was added to columns 1 and 2 (mock infected). The amount of each virus chosen was the lowest level of viral input sufficient to give a clear luciferase signal within the linear range for each viral strain. The plate was incubated for 1 h at 37°C. After incubation,  $10^4$  target cells (TZM-bl) in a volume of 100  $\mu$ l were added to each well. The plate was then placed into a humidified chamber within a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Luciferase activity was determined as mentioned above. Neutralization activity for all samples was measured in triplicate and reported as the percentage of luciferase activity  $\pm$  standard deviation.

Neutralization sensitivities of all recombinant viruses from the minipanel were assessed against previously characterized monoclonal antibodies. Neutralization assays were carried out as explained above with eight serial 4-fold dilutions of the following monoclonal antibodies (MAbs): b12, 2G12, 2F5, and 4E10 (4, 8, 11, 12, 19, 27, 54, 75-77, 81, 85). For MAb neutralizing assay, the values are expressed as the concentration of IgG that reduces infectivity by 50% (IC<sub>50</sub>).

For neutralization assays with *Renilla* RVs, viruses were preincubated with the IgGs purified from sera at a concentration of 0.2 mg/ml for 1 h at 37°C. The recombinant viruses previously neutralized with IgG were added in a volume of 50  $\mu$ l/well to cultures of U87.CD4.CCR5 or CXCR4 distributed in 96-well plates ( $2 \times 10^4$  cells/well). Neutralization assays are run in triplicate. Luciferase activity in cell lysates was assessed 48 h after infection using a 96-well plate luminometer (Orion; Berthold). Luciferase activities in cell lysates infected with nonneutralized viruses were considered 100%.

**Purification of IgG.** Immunoglobulin G was extracted from selected samples using protein A affinity chromatography. Briefly, 100  $\mu$ l of heat-inactivated serum was mixed with 500  $\mu$ l of sterile pH 7.4 phosphate-buffered saline and purified by using a protein A spin purification kit (Pierce, Rockford, IL). Purified IgG was further separated from smaller molecules by extensive dialysis with 50-kDa-cutoff membranes (Spectra/Por; Spectrum Medical Industries, Laguna Hills, CA). The 50-kDa exclusion limit has been previously recommended to eliminate traces of efavirenz (EFV) bound to plasma proteins (9, 10). The immunoglobulin was quantified using a mini-Bradford assay read on a microplate spectrophotometer (Tecan Trading AG, Switzerland). The flowthrough fraction, considered IgG depleted, was further diluted to reproduce the 1:200 serum dilution for neutralization testing. Two concentrations of purified IgG from selected serum samples (0.2 and 0.05 mg/ml) and the corresponding flowthrough fractions (1:200 dilution) were plated in triplicate in a 96-well plate and mixed with all the viruses from the minipanel plus Env-pseudotyped VSV. Neutralization assays were performed as mentioned above.

**In vitro assay for detection of traces of EFV antiretroviral activity.** We selected serum samples from one HIV-infected patient who was on antiretroviral treatment that does not include EFV and who has been classified as a broad neutralizer in our screening and one HIV-negative serum sample from a healthy

TABLE 2. Neutralization profiles of recombinant viruses used in the screening panel

Virus	Subtype	Tropism	Neutralization profile (IC <sub>50</sub> [mg/ml])			
			b12	2G12	2F5	4E10
VI191	A	R5	0.2	5	1	0.4
NL4-3	B	X4	0.3	0.5	2	2.5
AC10	B	R5	>6.25	>12.5	2	0.4
92BR025	C	R5	6	2	>12.5	7
92UG024	D	X4	3	1	4	4
CM224	AE	R5	>6.25	>12.5	2	2

volunteer. EFV was added to both serum samples to a final concentration of 5  $\mu$ g/ml. EFV-containing sera (and the corresponding controls with no EFV) were incubated at 37°C for 2 h. Immunoglobulin G fractions were purified/dialyzed as mentioned above. The corresponding flowthrough fractions were preserved for further analysis. All fractions were prepared for neutralizing assay as follows: purified/dialyzed IgGs were quantified and diluted to obtain a 0.2-mg/ml concentration; serum samples and flowthrough fractions were diluted to obtain 1:200 dilutions. All samples (with and without EFV) were divided into two aliquots, and one of them was boiled at 100°C for 30 min. All the fractions were subsequently tested against NL4-3, VI191, and pseudotyped VSV in a neutralization assay as mentioned above.

**Statistical analysis.** Variables were expressed as the medians and ranges or as proportions, as appropriate. The association of clinical data for all patients with neutralization breadth was tested using the Wilcoxon rank-sum test. Both comparisons were done, by patient, taking the first isolate recovered, and by isolate, taking all isolates available. A stratified analysis by the presence or absence of ART was done by assessing the association of clinical data and neutralization breadth in subjects under ART and in those untreated at the time of sampling. Statistical significance was defined as a *P* value of <0.05. All statistical analyses were carried out using the SPSS package (version 16; SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

**Definition of screening panel.** In this screening we used a minipanel of six recombinant viruses with envelopes from different subtypes and tropisms: VI191 subtype A and R5, 92BR025 subtype C and R5, 92UG024 subtype D and X4, AC10 subtype B and R5, CM224 subtype AE and R5, and NL4-3 subtype B and X4 (Table 2). These recombinant viruses were used in a TZM-bl cell line-based HIV neutralization assay. The RV neutralization assay has previously been validated by comparison with the current standardized pseudotype assays, and a good agreement was found (30, 32, 33). In order to determine whether the RVs in the panel adequately represented the global HIV-1 diversity, we have added the RVs in the panel to the phylogenetic analysis of a large group of 135 reference sequences from the different HIV-1 subtypes taken from the Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>). Phylogenetic analysis of the V3C3 region (aa 300 to 392, according to HxB2 numbering) of the recombinant viruses showed that the sequence diversity covered by the RV in the minipanel was a good representation of the diversity observed among circulating HIV-1 isolates (Fig. 1). We have also determined the overall resistance profile of the RVs in the panel measured against a group of the currently identified broadly neutralizing antibodies (bNAbs): b12, 2G12, 2F5, and 4E10 (Table 2). All the viruses in the panel were sensitive to MAb 4E10. All the viruses except 92BR025 were sensitive to 2F5, and all viruses except AC10 and CM224 were sensitive to b12 and 2G12.

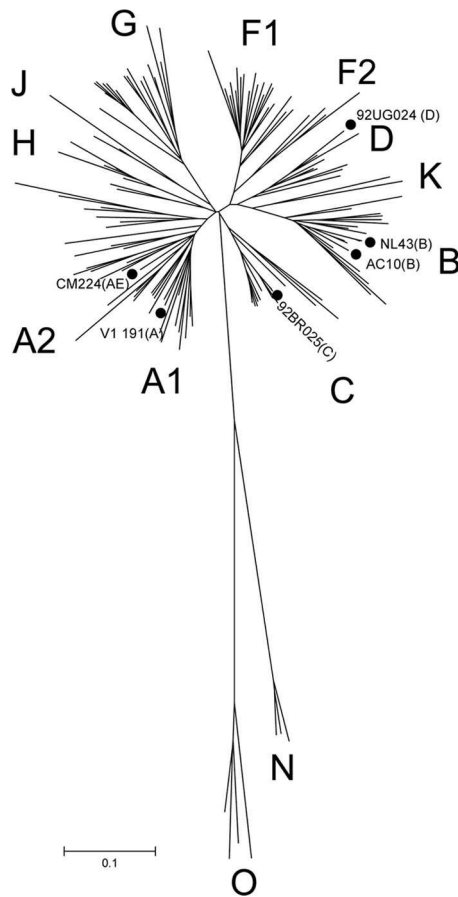


FIG. 1. Phylogenetic tree of HIV-1 V3C3 *env* region by the neighbor-joining method of 135 reference sequences downloaded from the Los Alamos database (<http://www.hiv.lanl.gov>) and the six recombinant viruses from different subtypes: V1191 subtype A, 92BR025 subtype C, 92UG024 subtype D, AC10 subtype B, CM244 subtype AE, and NL4-3 subtype B. Filled circles indicate the viruses included in the screening panel. The scale bar represents 10% nucleotide genetic distance.

**Initial screen for broad cross-neutralizing sera.** We next sought to use the screening panel to survey a group of serum samples for broadly neutralizing activity. Our panel included 508 samples taken from 364 HIV-1-seropositive (HIV<sup>+</sup>) indi-

viduals; for 235 individuals, samples from one time point were analyzed; for 129 individuals, samples from 2 to 4 time points were analyzed. For patients with more than one sample analyzed, time points of sample collection were anywhere from 2 months to 8 years apart. Each virus-serum sample combination was analyzed in triplicate at two dilutions (1/200 and 1/2,000). These dilutions were selected in order to minimize the inhibitory effect of the antiretroviral present in sera (10, 26). Table 3 summarizes the neutralization results for the 508 serum samples. A total of 4.8% of the samples from untreated patients (12 out of 248) achieved 50% neutralization of the 6 recombinant viruses from the panel at a  $\geq 1/200$  dilution. Complete neutralization curves were done with these sera, and the reciprocal dilutions of sera that reduce infectivity by 50% (ID<sub>50</sub>s) calculated from these curves are depicted in Table 4. In patients with samples from more than one time point analyzed, neutralization curves were done only with the serum sample from the first time point. The most notable neutralizing activity detected in this survey was observed in ART patients, in which 112 serum samples (43.1%) achieved 50% neutralization of all the viruses in the panel (33 at a  $\geq 1/200$  dilution and 79 at a  $\geq 1/2,000$  dilution). A detailed analysis of these samples and the corresponding treatment regimens revealed a strong correlation between EFV-containing treatment and viral inhibition. In fact, 97.3% (108 out of 111) of the serum samples from patients on EFV-containing treatment were able to neutralize all the viruses from the panel (29 at a 1/200 dilution and 79 at a 1/2,000 dilution). What is more, 71.2% (79 out of 111) of the serum samples from patients on treatment containing EFV achieved 50% neutralization at a  $\geq 1/2,000$  dilution. This inhibitory activity led us to question whether there was a significant inhibitory activity attributable to the residual antiviral drug (EFV) in sera.

**IgG purification from sera containing efavirenz.** Considering the strong association observed between EFV-containing treatment and viral inhibition, we performed some *in vitro* assays to evaluate the efficiency of our IgG purification system for removing EFV traces and to rule out the effect of the drug. In these assays, EFV (5  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to an HIV<sup>+</sup> serum sample and an HIV-negative (HIV<sup>-</sup>) serum sample. The concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$  was chosen for being higher than the highest concentration previously reported for plasma samples from EFV-treated patients (52, 53). Subsequently, EFV-con-

TABLE 3. Neutralization screening results for sera and purified IgG

Patient group	Total no. (%) of serum samples ( <i>n</i> = 508)	No. (%) of serum samples with ID <sub>50</sub> of:			No. (%) of purified IgG samples with IC <sub>50</sub> of:		No. of broadly neutralizing serum samples/total no. tested (%) considering <sup>a</sup> :	
		>2,000	<2,000 and >200	<200	>0.2 mg/ml	<0.2 mg/ml	All samples ( <i>n</i> = 508)	One sample per patient ( <i>n</i> = 364)
Untreated patient	248 (42.8)	0 (0)	12 (4.8)	236 (95.1)	240 (96.8)	8 (3.2)	8/248 (3.2)	7/191 (3.7)
Patients with ART containing:							6/260 (2.3)	3/173 (1.7)
EFV	111 (21.9)	79 (71.2)	29 (26.1)	3 (1.2)	106 (95.5)	5 (4.5)		
No EFV	149 (29.3)	0 (0)	4 (2.7)	145 (97.3)	148 (99.3)	1 (0.7)		

<sup>a</sup> A serum sample is a broad neutralizer when the corresponding IgG fraction neutralizes all the viruses in the panel at 50% with no significant neutralization of the VSV-pseudotyped control, when a 0.2-mg/ml concentration is used.

TABLE 4. Serum neutralization data (ID<sub>50</sub>s) for untreated patients capable of neutralizing all the viruses from the panel<sup>a</sup>

	11AdR	6AdR	7AdR	8AdR	2AdR	NL4-3
528-010	500	2000	900	2000	2000	5000
734-000	250	6000	200	600	400	5000
521-005	250	400	200	1000	2500	5000
600-003	200	600	200	1000	600	2000
363-014	600	700	200	500	700	3000
642-007	700	600	600	1000	700	>6400
308-040*	250	350	350	250	300	6000

<sup>a</sup> \*, for patient 308, ID<sub>50</sub> values were calculated from the second time point because of the limited amount of serum available from the first time point. Numbers indicate the ID<sub>50</sub>. A yellow box indicates an ID<sub>50</sub> of ≥200 but <1,000, an orange box indicates an ID<sub>50</sub> of ≥1,000 but <2,000, and a red box indicates an ID<sub>50</sub> of ≥2,000.

taining sera (and the corresponding controls with no antiretroviral) were incubated at 37°C in order to facilitate EFV association with serum proteins. After 2 h of incubation at 37°C, the IgG fraction was purified and extensively dialyzed with a 50-kDa-cutoff pore membrane. The inhibitory activities of each serum sample before and after EFV addition, the purified IgG, and the flowthrough fraction were analyzed using the neutralization assay described above. Each fraction was tested against two viruses from the minipanel (VI191 and NL4-3) and a VSV-pseudotyped virus that was included as a control for nonspecific neutralizing activity. Results are depicted in Table 5. HIV<sup>+</sup> and HIV<sup>-</sup> sera were able to inhibit replication of NL4-3, VI191, and the pseudotyped VSV after EFV addition. The analysis of the IgG fraction isolated from sera showed no viral inhibition attributable to the drug. In addition, the flowthrough fraction showed strong inhibition of the three viruses in the fractions that were preincubated with EFV.

EFV activity in sera has previously been proven to be strikingly resistant to temperature compared to a protein-mediated activity (10). In order to determine the effect of EFV in our assay, in the absence of IgG activity, we heated each fraction at 100°C for 30 min and tested the inhibition of NL4-3, VI191, and pseudotyped VSV. The analysis of the data revealed that all the fractions containing EFV retained the inhibitory activity after heat inactivation at 100°C. In addition, there was no inhibitory effect attributable to the drug in the purified IgG fraction (Table 5).

**Confirmation that there is a broadly neutralizing activity attributable to the IgG fraction of the sera.** In order to identify sera with IgG-associated broadly neutralizing activity, we isolated the IgG fraction from sera that achieved 50% neutralization of the 6 recombinant viruses from the panel at a 1/200 dilution (sera from untreated patients and patients treated

with ART with no EFV) and at a 1/2,000 dilution (patients on EFV-containing treatment). The purified IgGs were tested against the 6 recombinant viruses from the minipanel and against pseudotyped VSV, which was used as a specificity control. With this analysis, we were able to identify 14 IgG fractions purified from 12 patients that were able to achieve 50% neutralization against all the viruses in the panel using a concentration of 0.2 mg/ml, corresponding to a dilution range of 1/40 to 1/80, depending on the serum sample (Table 3). Two patients (521 and 308) showed a good neutralizing response at more than one time point. The neutralization results for these IgGs are depicted in Table 6. In order to rule out the effect of EFV traces in IgGs purified from EFV-containing sera, we heated all the IgG fractions at 100°C for 30 min and tested them against two viruses from the minipanel (NL4-3 and VI191). No neutralizing activity was observed (data not shown). These results indicate that the neutralizing activity observed in IgGs purified from patients with EFV-containing sera was not attributable to the presence of EFV traces in sera.

IgGs isolated from 8 of the best serum samples were tested against a new panel with 25 additional viruses from different subtypes using recombinant viruses that have the *Renilla* reporter gene in the *nef* locus. Neutralization results are summarized in Table 7. This new panel confirmed the broadly neutralizing activity of the sera previously selected with the 6-virus panel.

Broadly neutralizing sera were found in both patient groups: untreated and ART patients. The percentage of broadly neutralizing activity in untreated patients was 3.7% (7/191). The percentage of broadly neutralizing activity found in ART patients was similar: 1.7% (3/174; *P* = 0.34). In this analysis, we have included data for the sample from only the first time point for patients with more than one sample (*n* = 364). Similar percentages were found when all the serum samples were con-

TABLE 5. Evaluation of the purification method to isolate the IgG fraction from EFV-containing sera<sup>a</sup>

	Sera neutralization (1/200)			IgG neutralization (0.2 mg/ml)			Flow through neutralization (1/50)		
	VSV	NL4-3	V1 191	VSV	NL4-3	V1 191	VSV	NL4-3	V1 191
HIV-1 (+)	75.8±2.1	2.1±2.3	48.4±2.6	67.1±2.2	1.7±0.9	49.1±11.3	90.8±5.1	45.2±15.7	71.8±10.9
HIV-1 (+) + EFV	0.0±0.1	0.1±0.1	0.5±0.2	69.8±11.6	0.4±0.3	30.6±1.4	0.1±0.0	0.0±0.0	0.1±0.3
HIV-1 (-)	69.6±3.6	78.0±19.8	91.8±18.9	84.4±6.9	68.4±11.4	82.5±2.7	62.8±0.3	58.6±1.7	55.6±11.9
HIV-1 (-) + EFV	0.1±0.1	0.1±0.0	0.0±0.2	75.8±5.2	64.9±9.7	72.6±8.6	0.1±0.0	0.0±0.0	0.2±0.3
100°C heat inactivated HIV-1 (+)	73.4±13.8	50.2±3.5	133.9±12.2	103.7±11.1	91.8±9.0	138.6±11.0	98.4±5.9	109.3±37.9	100.8±28.2
100°C heat inactivated HIV-1 (+) + EFV	0.0±0.1	0.1±0.0	0.1±0.1	104.6±6.5	113.0±11.2	153.1±6.9	0.1±0.1	0.1±0.1	0.2±0.4
100°C heat inactivated HIV-1 (-)	101.8±3.5	70.8±4.1	120.8±3.4	91.8±7.1	84.9±6.7	124.8±1.9	91.3±38.4	41.3±0.3	51.5±15.4
100°C heat inactivated HIV-1 (-) + EFV	0.1±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1	103.1±10.2	88.3±14.2	132.5±17.4	0.0±0.0	0.0±0.1	0.2±0.4

<sup>a</sup> Numbers indicate percent luciferase activity (counts per second ± the standard deviation). A white box indicates >50% luciferase activity, a yellow box indicates <50% luciferase activity but >30% and a red box indicates <10% luciferase activity.

TABLE 6. IgG neutralization data (0.2 mg/ml) for patients capable of neutralizing all the viruses from the panel<sup>a</sup>

	V1 191 (A)	NL4-3 (B)	AC10 (B)	92BR025 (C)	92UG024 (D)	CM244 (E)	VSV
528-010	49.1±11.3	1.7±0.9	13.4±2.7	6.8±3.0	7.1±5.3	13.8±1.1	67.1±2.2
734-000	17.9±3.7	0.1±0.3	28.0±5.1	2.1±1.0	21.4±9.6	38.9±3.9	58.7±2.6
521-005	26.3±7.1	2.1±1.4	27.1±2.7	30.8±4.7	23.3±2.9	16.6±1.0	70.0±2.4
600-003	28.6±3.5	3.1±0.7	44.2±8.2	13.1±5.0	42.5±21.9	22.9±0.8	54.1±6.6
363-014	26.7±14.4	2.4±0.3	15.9±3.7	14.8±0.4	35.5±18.4	24.4±2.5	50.5±3.3
541-011	34.9±4.0	4.5±0.5	40.6±6.0	26.3±1.8	46.4±2.7	48.5±2.7	62.6±4.8
181-036	40.6±10.2	14.6±3.1	46.6±1.3	26.2±10.5	43.5±18.6	27.6±3.3	94.2±14.2
488-013	16.9±1.9	1.2±0.8	48.7±9.9	13.9±2.3	36.7±18.1	46.9±2.6	77.9±4.4
642-007	27.8±9.8	3.7±2.7	16.7±2.7	27.7±7.5	44.6±7.4	26.9±3.5	96.5±2.2
308-031	17.5±1.4	1.7±1.2	9.1±4.4	9.1±2.2	20.8±3.6	33.0±6.2	85.7±4.5
331-030	32.4±2.4	5.8±0.7	25.0±6.6	14.7±2.6	38.5±3.7	42.8±5.9	63.7±9.1
634-005	44.2±6.0	6.0±6.7	45.1±12.0	42.4±9.2	49.5±11.4	23.8±1.9	103.1±5.9

<sup>a</sup> Numbers indicate percent luciferase activity (counts per second ± standard deviation). A white box indicates >50% luciferase activity, a yellow box indicates <50% luciferase activity but >30%, an orange box indicates <30% luciferase activity but >10%, and a red box indicates <10% luciferase activity. For patients 521 and 308, data from only the first time point are shown.

sidered ( $n = 508$ ), with percentages of broadly neutralizing sera of 2.3% (6/260) for ART patients and 3.2% (8/248) for untreated patients ( $P = 0.59$ ). Results are depicted in Table 3.

**Stability of the IgG-associated broadly neutralizing response.** From seven of the patients that showed a broad neutralizing response, sera from more than one time point were analyzed. For these patients, time points were anywhere from 2 months to 4 years apart. The stabilities of the neutralizing responses for these patients are shown in Table 8. Two of the patients (488 and 331) acquired the neutralizing activity during the study course. In contrast, patients 363, 181, and 634 had a good neutralizing activity in the first sample but showed no activity in the sample from the second time point. Two of the patients (521 and 308) showed a good neutralizing activity that was stable during the study course. Especially significant was the case of patient 308, who showed a good neutralizing response that was stable for a 4-year period.

**The induction of a broad neutralizing activity does not correlate with viral load when ART patients are included in the study.** Clinical and demographic data for all patients were compared to the presence of neutralization breadth. Some clinical data corresponding to the 12 patients that showed a broad IgG-mediated neutralizing activity at one time point or more are depicted in Table 6. For this analysis we have considered that a serum sample is a broad neutralizer when the corresponding IgG fraction neutralizes all the viruses in the panel at 50% with no significant neutralization of the VSV-pseudotyped control, when a concentration of 0.2 mg/ml is used. The associations between breadth and clinical covariants were tested using nonparametric methods (Wilcoxon rank-sum test). In our panel of sera, no association between viral load and neutralization breadth was observed. We also found no association between CD8<sup>+</sup> counts, number of years on ART,

number of years since diagnosis, risk group, gender, and age and neutralization breadth. Next we did the same analysis considering only one sample per patient ( $n = 364$ ). In this analysis we also found a lack of association between CD4<sup>+</sup> T cell counts, CD8<sup>+</sup> counts, number of years on ART, number of years since diagnosis, risk group, gender, and age and neutralization breadth for both patient groups.

## DISCUSSION

The induction of cross-reactive broadly neutralizing antibodies is a critical line of research for HIV vaccine development. Our study represents the first large screening and evaluation of neutralization to date in individuals infected with HIV-1 including a large group of patients on aggressive antiretroviral treatment. Before the era of effective ART, it was widely reported that HIV infection leads to extensive defects in the humoral immune system (1, 16, 41, 47, 67) and that most of these B cell defects can be reversed by ART (13, 20, 58, 63). In the current study, we showed that patients on antiretroviral treatment are capable of inducing a broad and potent humoral immune response against HIV, despite having undetectable levels of viremia.

In the current study, a group of envelope sequences were phylogenetically analyzed, and 6 envelopes from 5 different subtypes were selected for the construction of the recombinant viruses for the minipanel. The phylogenetic analysis showed that this group of envelopes was a good representation of global HIV variation, including a diversity similar to the diversity of the screening panels used in previous studies (24, 28, 80). Different groups have tested the neutralizing activity in plasma or serum samples from a large group of individuals on different pseudovirus panels and reported that screening for a

TABLE 7. Cross-neutralizing properties of purified IgGs selected from broadly neutralizing sera<sup>a</sup>

Virus	No. (%) of purified IgG samples							
	528-010	734-000	521-005	600-003	363-014	642-007	308-40	331-30
Clade B (total $n = 18$ )	17 (94)	12 (65)	8 (47)	13 (71)	13 (71)	11 (59)	14 (76)	16 (88)
Clades no B (total $n = 7$ )	5 (71)	2 (29)	1 (14)	4 (57)	3 (43)	4 (57)	6 (86)	1 (14)

<sup>a</sup> Neutralization was considered positive if 50% neutralization was achieved at an IgG concentration of less than 0.2 mg/ml.

TABLE 8. Clinical characteristics of the patients that showed an IgG-associated broadly neutralizing activity at one time point or more

Patient	Sample	Time (mo) of study course	bNAb (IgG) <sup>a</sup>	CD4 <sup>+</sup> (cells/ml)	CD8 <sup>+</sup> (cells/ml)	VL <sup>b</sup>	Peak VL	CD4 nadir (cells/ml)	ART
528	010	0	+	750	1,024	26,000	104,000	354	
734	000	0	+	500	942	1,422	1,422	491	
521	005	0	+	559	2,163	2,232	1000,000	222	
	006	15	+	637	2,240	3,455	1000,000	222	
600	003	0	+	1,608	1,366	2,440	297,000	1,008	
363	014	0	+	581	664	7,367	7,367	537	
	015	12	–	686	987	7,950	7,950	537	
541	011	0	+	499	576	<50	78,339	286	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir
181	036	0	+	437	857	<50	39,947	266	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir
488	012	0	–	334	998	975	3,038	334	
	013	17	+	295	1,042	<50	5,188	291	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir
642	007	0	+	272	799	89,356	107,300	272	
308	031	0	+	583	2,435	9,003	12,069	460	
	040	35	+	448	2,304	19,005	19,005	448	
	041	49	+	530	1,698	49	27,462	410	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir
331	029	0	–	80	770	85,454	460,000	80	Zidovudine + lopinavir + ritonavir + emtricitabine + tenofovir
	030	2	+	75	1,101	509	85,454	75	Zidovudine + lopinavir + ritonavir + emtricitabine + tenofovir
634	005	0	+	686	1,291	<50	134,500	378	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir
	006	4	–	587	1,522	–	134,500	378	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir

<sup>a</sup> +, the corresponding IgG fraction neutralizes all the viruses in the panel at 50% with no significant neutralization of the VSV-pseudotyped control, when a 0.2-mg/ml concentration is used; –, the corresponding IgG fraction does not neutralize all the viruses in the panel at 50%.

<sup>b</sup> The limit of detection was 50 copies/ml.

reduced panel (5 or less) of selected viruses provided similar information on the presence of cross-reactive neutralizing activity as screening for a large pseudovirus panel (24, 28, 80). In our study, the prevalence of patients with broadly cross-neutralizing antibodies was lower than that observed in prior studies. A total of 2.7% of the patients showed IgG-mediated neutralizing activity against all the viruses from a panel consisting of 6 viruses with envelopes from 5 different subtypes. The differences in the prevalence of cross-reactive neutralizing activity observed in this study compared to previous studies are probably due to the usage of a more restrictive selection criterion. All these studies use an ID<sub>50</sub> of >100 as a cutoff for neutralization, and the cross-reactive sera are supposed to neutralize viruses from 2, 3, 4, or 5 subtypes, depending on the study. In this study the initial cutoff for untreated and no-EFV-treated patients was higher than the one used previously (ID<sub>50</sub> > 200). The selection criterion for patients on an EFV-containing treatment was even more restrictive (ID<sub>50</sub> > 2,000) due to the nonspecific inhibition observed in these patient serum samples. The neutralization sensitivities of the purified IgGs from the selected sera were determined and used to define the cutoff for cross-reactive neutralization. We consider strong cross-reactive neutralizing activity in serum to be the ability to neutralize the 6 viruses of our minipanel that contain envelopes from 5 different subtypes at an IC<sub>50</sub> titer of <0.2 mg/ml of purified IgG. Our definition of cross-reactive neutralizing activity is closer to the definition used by Simek et al. (80) for elite neutralizing activity, which considers elite activity to be “the ability to neutralize, on average, more than one pseudovirus at an IC<sub>50</sub> titer of 300 within a clade group and across at least four clade groups.”

A small number of patients with a broad neutralizing response have been previously described. However, most of the

LTNP patients show a poor humoral immune response (39, 87). Several studies have compared the induction of broadly neutralizing antibodies in LTNPs to that in progressor patients with detectable levels of viremia (3, 23, 24, 46, 50, 71). Among progressor patients, a significant group of sera with broad and potent neutralizing activity was observed. In contrast, significantly lower titers of NAbs to laboratory isolates as well as lower levels of broadly cross-neutralizing antibodies were found in LTNP patients. This inefficient humoral immune response has been attributed to the low levels of antigenic stimulation. In fact, several studies have shown a positive correlation between plasma viral load and titers of neutralizing antibodies to heterologous virus (21, 23, 73, 78), suggesting that the development of these antibodies was a consequence of viral replication. In the present study, we examined the breadth of neutralization in a large cohort of patients, including patients on highly active antiretroviral therapy (HAART) with persistent undetectable viremia. Remarkably, we found a similar percentage of broadly neutralizing sera in ART patients with VLs of <50 (1.7%) and untreated patients with detectable viremia (3.7%). These results indicate that the level of antigen required for the development of a broad neutralizing response in ART patients is very low, below the limit of detection with the currently used assays. We hypothesize that the good humoral immune response induced in these patients, despite the low levels of antigenic stimulation, could be a consequence of the improved B cell function associated with antiretroviral treatment. Our results are in stark contrast to the data obtained from long-term nonprogressors, whose little neutralizing activity has been attributed to the low levels of viral replication. Our data show that ART patients are capable of inducing a good antibody response; however, LTNP patients have a poor humoral immune response against HIV-1, accord-

ing to previous reports (3, 23, 24, 46, 50, 71). One possible explanation is that this response has persisted from the pre-ART time. In the longitudinal study, we have two patients whose sera were analyzed before and after treatment. Patient 308 had preexisting broadly neutralizing activity. However, patient 488 showed no significant neutralizing activity before treatment. The longitudinal data obtained in the present study are not complete enough to support or discard this hypothesis. Another possible explanation for these data could be based on differences in the B cell status between ART patients and LTNPs. There is little information about the status of B cells in LTNPs. However, Titanji et al. (83) investigated the serologic memory to non-HIV antigens in different groups of HIV-infected patients. They found that while progressor patients had severe defects in serologic memory, long-term nonprogressors had memory B cell frequencies and levels of antigen-specific antibodies comparable to those of noninfected individuals. According to this study, LTNPs showed no B cell defect that can explain the deficient humoral immune response against HIV. A third possible explanation for the different induction of neutralizing antibodies between ART patients and LTNPs is that the levels of viral replication may be higher in ART patients than LTNPs, even though both groups of patients have levels of viremia below the detection limit (<50 copies/ml) of clinically used viral load assays (70). In fact, the presence of low levels of viremia detectable by more sensitive assays (25, 31, 37, 51, 68, 71) has been demonstrated in most patients receiving standard HAART, but the source of this remains unclear. In addition, ART patients had high levels of viremia prior to the initiation of treatment that contributed to the establishment of cellular reservoirs. Low-level viremia may arise from viral expression in the cellular reservoirs established before HAART (2, 36–38, 42, 64, 68, 72, 84) or from low levels of complete cycles of virus replication (17, 18, 84). The observation that the HIV-1 envelope induces predominantly short-lived memory B cell-dependent plasma Abs (7) supports the idea that low levels of viremia could be required for the induction of bNAbs in ART patients. The presence of ongoing virus replication during long-term suppressive HAART is supported by findings of sequence evolution with the appearance of new drug-resistant variants in a subset of patients during seemingly effective HAART (17, 84) and decreases in plasma viremia with treatment intensification (37). In contrast, little is known about viral replication in LTNPs with levels of viremia below 50 copies/ml. Several studies suggest that infection with replication-defective virus explains the absence of detectable circulating virus in some LTNPs (14, 43, 48, 49, 60, 86). These patients could have inefficient antigen stimulation of their B cells caused by a deficient viral replication. However, this cannot be the explanation in the case of LTNPs in which no defect in viral replication has been observed and the control of viral replication has been attributed to host genetic or immune mechanisms (3, 15, 40, 45, 56, 57).

In this study we have also identified two patients that made a broad neutralizing response that was stable over long periods of time, up to 4 years. The identification and detailed analysis of these patients may provide valuable information to improve the induction of an effective and stable humoral immune response.

In contrast to previous studies (73, 78), we observed no

correlation between neutralization breadth and viral load. The previously reported correlation between viral load and neutralization breadth suggested that a vaccine may need to supply viral antigen for long periods of time to allow antibody maturation and development of a broad neutralizing response. This suggestion was supported by the observation that HIV-1 bNAbs often show significant degrees of affinity maturation (69, 79). Whether the extensive maturation requires several years of antigen exposure or high levels of replication needs to be determined. To date, no bNAb has been isolated from ART patients. Therefore, the level of maturation of these antibodies is unknown but may be lower, consistent with the low viral loads. The results of the present study suggest that the requirement of high levels of viral replication for the induction of bNAbs may be true only for untreated HIV-infected individuals, which have several B cell abnormalities associated with HIV replication-induced immune cell activation, and not for uninfected individuals or ART patients (in therapeutic vaccine approaches).

In this study we have also observed that traces of antiretroviral drug present in sera from ART patients showed a strong inhibitory effect of traces of efavirenz in sera. In order to separate the effect of traces of antiretroviral drugs or any other nonspecific factor present in sera from the immunoglobulin-mediated effect, we decided to purify IgGs from all the sera that showed good viral inhibition and analyzed their neutralizing activity. We were able to confirm the presence of IgG-associated neutralizing activity in 5 serum samples from patients on EFV-containing treatment. We were able to rule out the effect of EFV traces in these IgGs after observing that this activity was not effective against the VSV specificity control (Table 5) and proving that it was sensitive to heat inactivation at 100°C. The observation that soluble factors present in sera can have an inhibitory viral effect suggests that measurements of HIV-1 neutralization by crude serum and plasma samples must be carried out with some caution.

In summary, the present study demonstrated an induction of a broad humoral immune response in patients on antiretroviral treatment that have undetectable viremia. In these patients, the low level of antigenic stimulation may be compensated for by an improved B cell function induced by antiretroviral treatment. We hypothesize that local residual viral replication, together with an improved B cell function, in ART patients is capable of inducing a broad antibody response that is similar to the response induced in untreated progressor patients with detectable viremia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ana García and María T. García for technical assistance and Jacqueline Bixby for assistance in preparing the manuscript. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: TZM-bl from John C. Kappes, Xiaoyun Wu, and Tranzyme Inc.; HIV-1 gp120 monoclonal antibody (IgG1 b12) from Dennis Burton and Carlos Barbas; and HIV-1 gp120 monoclonal antibody (2G12) and HIV-1 gp41 monoclonal antibodies (2F5 and 4E10) from Hermann Katinger.

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (RYC-2007-00788), the Instituto de Salud Carlos III (FIS PS09/01459, FIS PS09/01297, FIS PI09/01459, RETIC RD06/0006), the FP6 and FP7 Networks of Excellence from the EU (EUROPRIME and

CHAARM), and FIPSE (36630/07, 36780/08), Ayuda para el fomento de la traslación de la aplicación terapéutica de medicamentos de uso humano, huérfanos y terapias avanzadas (TRA-094). M.M.-R. is supported by a Consejo de Ciencia y Tecnología de México fellowship.

## REFERENCES

1. Ammann, A. J., et al. 1984. B-cell immunodeficiency in acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* **251**:1447–1449.
2. Bailey, J. R., et al. 2006. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J. Virol.* **80**:6441–6457.
3. Bailey, J. R., T. M. Williams, R. F. Siliciano, and J. N. Blankson. 2006. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* **203**:1357–1369.
4. Barbas, C. F., et al. 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:9339–9343.
5. Beirnaert, E., et al. 2000. Identification and characterization of sera from HIV-infected individuals with broad cross-neutralizing activity against group M (env clade A-H) and group O primary HIV-1 isolates. *J. Med. Virol.* **62**:14–24.
6. Binley, J. M., et al. 2008. Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. *J. Virol.* **82**:11651–11668.
7. Bonsignori, M., et al. 2009. HIV-1 envelope induces memory B cell responses that correlate with plasma antibody levels after envelope gp120 protein vaccination or HIV-1 infection. *J. Immunol.* **183**:2708–2717.
8. Buchacher, A., et al. 1994. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:359–369.
9. Burrer, R., et al. 2001. Immunoglobulin G (IgG) and IgA, but also nonantibody factors, account for in vitro neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by serum and plasma of HIV-infected patients. *J. Virol.* **75**:5421–5424.
10. Burrer, R., et al. 2006. Efavirenz in plasma from HIV-infected patients does not directly block reverse transcriptase activity in cell-free assays but inhibits HIV replication in cellular assays. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **22**:865–869.
11. Burton, D. R., et al. 1991. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:10134–10137.
12. Burton, D. R., et al. 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**:1024–1027.
13. Cagigi, A., A. Nilsson, A. De Milito, and F. Chiodi. 2008. B cell immunopathology during HIV-1 infection: lessons to learn for HIV-1 vaccine design. *Vaccine* **26**:3016–3025.
14. Candotti, D., et al. 1999. Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT Study Group. *J. Med. Virol.* **58**:256–263.
15. Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrin, and D. D. Ho. 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**:201–208.
16. Carbone, A., et al. 1985. Lymph node immunohistology in intravenous drug abusers with persistent generalized lymphadenopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**:1007–1012.
17. Cohen Stuart, J. W., et al. 2001. Transient relapses (“blips”) of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **28**:105–113.
18. Coiras, M., M. R. Lopez-Huertás, M. Perez-Olmeda, and J. Alcamí. 2009. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:798–812.
19. Crawford, J. M., et al. 1999. Characterization of primary isolate-like variants of simian-human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **73**:10199–10207.
20. Deeks, S. G., et al. 2006. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J. Virol.* **80**:6155–6164.
21. De Milito, A., et al. 2004. Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood* **103**:2180–2186.
22. Derdeyn, C. A., et al. 2000. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* **74**:8358–8367.
23. Doria-Rose, N. A., et al. 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* **84**:1631–1636.
24. Doria-Rose, N. A., et al. 2009. Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J. Virol.* **83**:188–199.
25. Dornadula, G., et al. 1999. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* **282**:1627–1632.
26. Dreyer, K., et al. 1999. Primary isolate neutralization by HIV type 1-infected patient sera in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**:1563–1571.
27. Etemad-Moghadam, B., et al. 1999. Determinants of neutralization resistance in the envelope glycoproteins of a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J. Virol.* **73**:8873–8879.
28. Euler, Z., et al. 2010. Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J. Infect. Dis.* **201**:1045–1053.
29. Feikin, D. R., C. Feldman, A. Schuchat, and E. N. Janoff. 2004. Global strategies to prevent bacterial pneumonia in adults with HIV disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**:445–455.
30. Fenyó, E. M., et al. 2009. International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report. *PLoS One* **4**:e4505.
31. Furtado, M. R., et al. 1999. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **340**:1614–1622.
32. García-Pérez, J., S. Sánchez-Palmino, M. Pérez-Olmeda, B. Fernández, and J. Alcamí. 2007. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.* **79**:127–137.
33. Gonzalez, N., et al. 2010. A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2493–2501.
34. Graham, B. S. 2002. Clinical trials of HIV vaccines. *Annu. Rev. Med.* **53**:207–221.
35. Gray, E. S., et al. 2009. Antibody specificities associated with neutralization breadth in plasma from human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected blood donors. *J. Virol.* **83**:8925–8937.
36. Havlir, D. V., et al. 2001. Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination HIV therapy. *JAMA* **286**:171–179.
37. Havlir, D. V., et al. 2003. Productive infection maintains a dynamic steady state of residual viremia in human immunodeficiency virus type 1-infected persons treated with suppressive antiretroviral therapy for five years. *J. Virol.* **77**:11212–11219.
38. Hermankova, M., et al. 2001. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA* **286**:196–207.
39. Humbert, M., et al. 2007. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur. J. Immunol.* **37**:501–515.
40. Hunt, P. W., et al. 2008. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* **197**:126–133.
41. Kekow, J., P. Kern, H. Schmitz, and W. L. Gross. 1986. Abnormal B-cell response to T-cell-independent polyclonal B-cell activators in homosexuals presenting persistent generalized lymph node enlargement and HTLV-III antibodies. *Diagn. Immunol.* **4**:107–111.
42. Kieffer, T. L., et al. 2004. Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J. Infect. Dis.* **189**:1452–1465.
43. Kloosterboer, N., et al. 2005. Natural controlled HIV infection: preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* **339**:70–80.
44. Kroon, F. P., et al. 1998. Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **12**:F217–F223.
45. Lambotte, O., et al. 2005. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* **41**:1053–1056.
46. Lambotte, O., et al. 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **23**:897–906.
47. Lane, H. C., et al. 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **309**:453–458.
48. Learmont, J. C., et al. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**:1715–1722.
49. Lum, J. J., et al. 2003. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* **111**:1547–1554.
50. Mahalanabis, M., et al. 2009. Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naive human immunodeficiency virus controllers. *J. Virol.* **83**:662–672.
51. Maldarelli, F., et al. 2007. ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog.* **3**:e46.
52. Mallon, P. W., J. Ray, and D. A. Cooper. 2003. Effect of therapeutic drug

- monitoring on outcome in antiretroviral experienced HIV-infected individuals. *J. Clin. Virol.* **26**:223–227.
53. **Marzolini, C., et al.** 2001. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* **15**:71–75.
  54. **Mascola, J. R., et al.** 1999. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**:4009–4018.
  55. **Mascola, J. R., et al.** 1996. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J. Infect. Dis.* **173**:340–348.
  56. **Migueles, S. A., et al.** 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* **3**:1061–1068.
  57. **Migueles, S. A., et al.** 2000. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:2709–2714.
  58. **Moir, S., and A. S. Fauci.** 2009. B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:235–245.
  59. **Moir, S., et al.** 2008. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J. Infect. Dis.* **197**:572–579.
  60. **Mologni, D., et al.** 2006. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS* **20**:567–574.
  61. **Moog, C., H. J. Fleury, I. Pellegrin, A. Kirn, and A. M. Aubertin.** 1997. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* **71**:3734–3741.
  62. **Moore, J. P., et al.** 1996. Inter- and intracade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *J. Virol.* **70**:427–444.
  63. **Morris, L., et al.** 1998. HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* **188**:233–245.
  64. **Nettles, R. E., et al.** 2005. Intermittent HIV-1 viremia (blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* **293**:817–829.
  65. **Newman, R. M., et al.** 2006. Balancing selection and the evolution of functional polymorphism in Old World monkey TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:19134–19139.
  66. **Overton, E. T., et al.** 2005. Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. *Clin. Infect. Dis.* **41**:1045–1048.
  67. **Pahwa, S. G., M. T. Quilop, M. Lange, R. N. Pahwa, and M. H. Grieco.** 1984. Defective B-lymphocyte function in homosexual men in relation to the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **101**:757–763.
  68. **Palmer, S., et al.** 2008. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:3879–3884.
  69. **Pancera, M., et al.** 2010. Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J. Virol.* **84**:8098–8110.
  70. **Perelson, A. S., et al.** 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**:188–191.
  71. **Pereyra, F., et al.** 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* **197**:563–571.
  72. **Persaud, D., et al.** 2004. Continued production of drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 in children on combination antiretroviral therapy who have undetectable viral loads. *J. Virol.* **78**:968–979.
  73. **Piantadosi, A., et al.** 2009. Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. *J. Virol.* **83**:10269–10274.
  74. **Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophage-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**:2855–2864.
  75. **Purtscher, M., et al.** 1996. Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS* **10**:587–593.
  76. **Purtscher, M., et al.** 1994. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1651–1658.
  77. **Roben, P., et al.** 1994. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:4821–4828.
  78. **Sather, D. N., et al.** 2009. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **83**:757–769.
  79. **Scheid, J. F., et al.** 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**:636–640.
  80. **Simek, M. D., et al.** 2009. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* **83**:7337–7348.
  81. **Stiegler, G., et al.** 2001. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**:1757–1765.
  82. **Takeuchi, Y., M. O. McClure, and M. Pizzato.** 2008. Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* **82**:12585–12588.
  83. **Titanji, K., et al.** 2006. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood* **108**:1580–1587.
  84. **Tobin, N. H., et al.** 2005. Evidence that low-level viremia during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J. Virol.* **79**:9625–9634.
  85. **Trkola, A., et al.** 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **70**:1100–1108.
  86. **Wang, B., et al.** 2003. First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* **312**:135–150.
  87. **Wang, Q., et al.** 2008. High level serum neutralizing antibody against HIV-1 in Chinese long-term non-progressors. *Microbiol. Immunol.* **52**:209–215.
  88. **Wang, S., et al.** 2008. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine* **26**:1098–1110.
  89. **Wei, X., et al.** 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1896–1905.